

**Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin**  
**der Tierärztlichen Fakultät**  
**der Ludwig-Maximilians-Universität München**

*Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann*

**„Klinische Untersuchungen, Blutparameter und**  
**Erregerausscheidung von splenektomierten und nicht-**  
**splenektomierten Schweinen nach experimenteller Infektion mit**  
***Mycoplasma suis*“**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Carolin Jannasch

aus Lauchhammer

*München 2014*

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. J. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Birgit Viertlböck

Tag der Promotion: 12. Juli 2014

*Meiner Familie und meinem Freund*

<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>IV</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>VII</b>
<b>I. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II. LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
1. Historischer Überblick .....	3
2. Taxonomie .....	3
3. <i>Hämoplasmen</i> als Zoonoseerreger .....	5
4. Morphologie und mikrobielle Eigenschaften .....	6
5. Pathogenese und Immunologie .....	7
6. Untersuchungen zu invasiven <i>M. suis</i> -Stämmen.....	12
7. Klinisches Bild.....	13
8. Übertragung von <i>M. suis</i> .....	15
9. Diagnostik.....	15
9.1. Klinische Diagnose .....	15
9.2. Hämatologische Veränderungen.....	16
9.3. Biologische Diagnose .....	17
9.4. Mikroskopischer Erregernachweis .....	18
9.5. Pathomorphologische und pathohistologische Veränderungen .....	19
9.6. Molekularbiologischer Erregernachweis .....	20
9.7. Serologische Nachweisverfahren.....	20
10. Therapie und Prophylaxe.....	21
11. Verbreitung von <i>M. suis</i> .....	22
<b>III. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>23</b>
1. Durchführung des Tierversuchs.....	23
1.1. Genehmigung des Tierversuchsvorhabens .....	23
1.2. Versuchstiere .....	23
1.3. Vorversuch.....	24
1.4. Hauptversuch .....	24
1.4.1. Versuchsablauf im Überblick .....	24

1.4.2. Durchführung der Splenektomie.....	25
1.4.3. Infektion.....	26
1.4.4. Klinische Untersuchung.....	27
1.4.5. Probengewinnung .....	29
1.4.6. Bearbeitung der Proben .....	29
1.4.6.1. Mikroskopischer Erregernachweis .....	29
1.4.6.2. Hämatologische und klinisch-chemische Blutuntersuchungen .....	30
1.4.6.3. Extraktion der <i>M. suis</i> -DNA.....	30
1.4.6.4. <i>M. suis</i> -spezifische quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion .....	31
1.4.6.5. Nachweis der <i>M. suis</i> -spezifischen humoralen Immunantwort .....	32
1.4.7. Statistische Auswertung.....	33
<b>IV. ERGEBNISSE .....</b>	<b>34</b>
<b>1. Ergebnisse des Vorversuchs.....</b>	<b>34</b>
<b>2. Ergebnisse des Hauptversuchs .....</b>	<b>34</b>
2.1. Klinische Untersuchung.....	34
2.1.1. Klinische Untersuchung bei den splenektomierten Tieren .....	34
2.1.2. Klinische Untersuchung bei den nicht splenektomierten Tieren .....	35
2.2. Mikroskopischer Erregernachweis .....	37
2.3. Hämatologische Parameter .....	37
2.4. Klinisch-chemische Parameter .....	41
2.5. Erregermenge im Blut.....	46
2.6. Erregermenge in den Tupfer-, Urin- und Kotproben .....	50
<b>3. Humorale Immunantwort.....</b>	<b>52</b>
<b>V. DISKUSSION.....</b>	<b>53</b>
<b>1. Klinischer Verlauf .....</b>	<b>54</b>
<b>2. Auswirkungen von <i>M. suis</i> auf die untersuchten Blutparameter.....</b>	<b>56</b>
<b>3. Erregermenge im Blut.....</b>	<b>59</b>
<b>4. Untersuchungen zur humoralen Immunantwort .....</b>	<b>59</b>
<b>5. Ausscheidungsverhalten von <i>M. suis</i>.....</b>	<b>60</b>
<b>VI. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>63</b>
<b>VII. SUMMARY.....</b>	<b>65</b>

---

<b>VIII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>66</b>
<b>IX. TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>68</b>
<b>X. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>69</b>
<b>XI. DANKSAGUNG.....</b>	<b>79</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

ABTS	2,2-Azino-di[3-ethyl-Benzthiazolinsulfat]
AIHA	autoimmune hämolytische Anämie
bp	Basenpaare
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HspA1	Heat shock protein A1
HRP	Horseradish-Peroxidase-konjugiertes anti-Schwein-Konjugat
IAP	infectious anemia in pigs (infektiöse Anämie von Schweinen)
LC-PCR	LightCycler-Polymerasekettenreaktion
MCH	mittleres korpuskuläres Hämoglobin
MCHC	mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
MCV	mittleres korpuskuläres Volumen
<i>M. suis</i>	<i>Mycoplasma suis</i>
MSG1	<i>M. suis</i> GAPDH like Protein
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
p.i.	post infectionem
RBC	red blood cells
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
<i>spp.</i>	Spezies

## I. EINLEITUNG

Infektionen mit dem hämotrophen Bakterium *Mycoplasma suis* (ehemals *Eperythrozoon suis*) sind weltweit von großer Bedeutung für die Schweinehaltung (Hoelzle et al., 2011). *Mycoplasma suis* (*M. suis*) ist das ätiologische Agens der infektiösen Anämie des Schweins (IAP) (Hoelzle et al., 2011). Diese, auch als porcine Eperythrozoonose bekannte Faktorenkrankheit, kann bei Schweinen aller Alters- und Nutzungsgruppen auftreten (Hoelzle, 2008). Einmal infizierte Tiere bleiben ihr Leben lang latente Träger des Bakteriums, und auch durch antibiotische Behandlung erfolgt in der Regel keine Erregereliminierung (Hoelzle et al., 2011). Obwohl Infektionen mit *M. suis* seit mehr als 80 Jahren bekannt sind, gibt es offene Fragen zu den Übertragungswegen des Erregers. Bisher wurde lediglich die Übertragung von *M. suis* über Blut-assoziierte Wege wie z.B. zootechnische und therapeutische Manipulationen und kleinere Verletzungen nachgewiesen. Eine Übertragung von *M. suis* über Sekrete, Harn oder Kot wurde bisher noch nicht untersucht.

Neueren Untersuchungen zufolge existieren verschiedene *M. suis*-Stämme, die sich in ihrer Virulenz unterscheiden (Felder et al., 2012). So konnte insbesondere gezeigt werden, dass das *M. suis*-Isolat 08/07 die Fähigkeit besitzt in Erythrozyten einzudringen, das invasive *M. suis*-Isolat KI3806 Zellen des Gefäßendothels kolonisiert und Isolate unterschiedlicher Virulenz in der Lage sind, Eryptose (i.e. programmierten Zelltod von Erythrozyten) auszulösen (Groebel et al., 2009; Felder et al., 2011; Sokoli et al., 2013). Die molekularen Mechanismen dieser Prozesse sind jedoch nicht vollständig geklärt und über die klinischen Auswirkungen von Erythrozyten-invasiven Isolaten ist bisher wenig bekannt. Um den derzeitigen Wissensstand über invasive *M. suis*-Isolate zu erweitern, sollten in dieser Studie Kenntnisse über den klinischen Verlauf und die Auswirkungen auf die Blutparameter von experimentell infizierten Schweinen gewonnen werden.

In der vorliegenden Studie wurde erstmals der Verlauf einer experimentellen Infektion mit dem hochvirulenten und invasiven *M. suis*-Isolat KI3806 bei splenektomierten und nicht splenektomierten Schweinen vergleichend dargestellt. Dazu wurde eine Korrelation zwischen der Erregermenge im Blut und der klinischen Symptomatik sowie den hämatologischen Parametern untersucht.



Zusätzlich wurden Speichel, Nasen-, und Vaginaltupfer, sowie Urin und Kotproben auf das Vorhandensein von *M. suis*-DNA untersucht, um Aufschluss über mögliche Übertragungswege zu geben. Die daraus resultierenden Ergebnisse sollen als Basis für neue Erkenntnisse zur Pathogenese, Übertragungswege und immunologischen Parametern nach experimenteller Infektion mit *M. suis* fungieren.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Historischer Überblick

Im Jahre 1928 wurden von Schilling in Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen von splenektomierten Mäusen erstmals vermeintliche Blutparasiten von ringförmiger Gestalt beobachtet. Diese waren vorwiegend auf der Oberfläche morphologisch veränderter Erythrozyten zu finden. Aufgrund ihrer Morphologie, ihrer oberflächlichen Lage auf den Erythrozyten und weil er sie den Protozoen nahe stehend vermutete, bezeichnete Schilling diese als „*Eperythrozoon coccoides*“ (Schilling, 1928).

Doyle (1932) erhob ähnliche Befunde, als er Blutaussstriche von zwei bis acht Monate alten Schweinen untersuchte, die durch Iktereanämie, Dyspnoe, Fieber und Schwäche auffielen. Doyle (1932) verwendete für die Erkrankung die Bezeichnung „anaplasmosis like disease“.

Kinsley und Ray (1934) berichteten von dem vermehrten Auftreten von Ohrtrandnekrosen in nordamerikanischen Schweinebetrieben in Illinois, Iowa, South Dakota und Missouri und stellten einen Zusammenhang zu der als „anaplasmosis like disease“ bezeichneten Erkrankung fest.

Splitter und Williamson (1950) erkannten schließlich die Ähnlichkeit des Erregers der „anaplasmosis like disease“ zu den beim Rind bzw. Schaf bekannten *Eperythrozoon wenyonii* und *ovis*, und führten die Bezeichnung *Eperythrozoon suis* ein.

In Deutschland wurde die Eperythrozoonose beim Schwein erstmals von Korn und Mussgay (1968) im Rahmen der Aufklärung eines Schweinepestverdachts diagnostiziert.

### 2. Taxonomie

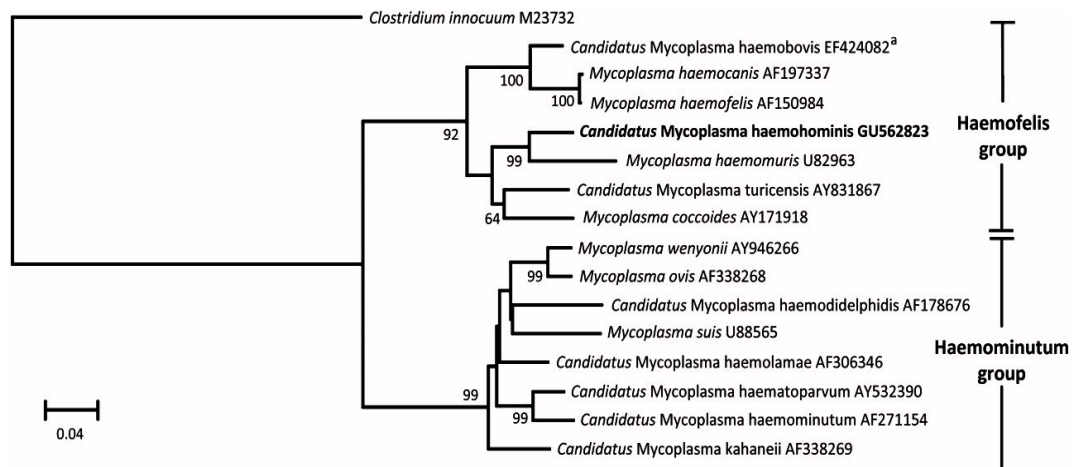
Bis 2001 wurde *M. suis* aufgrund der Größe, der möglichen Übertragung durch Arthropoden und der Unkultivierbarkeit innerhalb der Ordnung der *Rickettsiales*, der Familie *Anaplasmataceae* und dem Genus *Eperythrozoon* zugeordnet

(Neimark et al., 2001). Aufgrund umfangreicher phylogenetischer Untersuchungen der 16S rDNA erfolgte eine Reklassifizierung von Vertretern der Genera *Eperythrozoon* und *Haemobartonella* innerhalb der Klasse *Mollicutes* und Familie *Mycoplasmataceae* zum Genus *Mycoplasma* als sogenannte hämotrophe Mykoplasmen oder auch Hämoplasmen (Neimark et al., 2001; Neimark et al., 2002). Neben der genetischen bzw. phylogenetischen Komponente sind weitere Eigenschaften von *M. suis* und anderen Hämoplasmen vorhanden, die charakteristisch für das Genus der Mykoplasmen sind. Sie sind überwiegend epizellulär an der Erythrozytenoberfläche zu finden, besitzen weder eine Zellwand noch Flagellen und sind empfindlich gegenüber Tetrazyklinen und unempfindlich gegenüber Penicillinen (Neimark et al., 2001). Die taxonomische Zuordnung wurde weiterhin durch Peters und Mitarbeiter (2008) durch die Analyse des RNase P RNA Gens bestätigt. Aktuell wird aber die taxonomische Klassifizierung von *M. suis* und der anderen Vertreter der Hämoplasmen wieder diskutiert. In der aktuellen Ausgabe des „Bergey's Manual of Systematic Bacteriology“ wurden Hämoplasmen innerhalb der Ordnung *Mycoplasmatales* der Familie „*insertae sedis*“ zugeordnet. Neueste phylogenetische Untersuchungen an den nicht-ribosomalen Genen der Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase (*gapA*) und dem Hitzeschockprotein 70 (*dnaK*) haben bestätigt, dass eindeutige taxonomische Unterschiede zwischen Hämoplasmen und klassischen Mykoplasmen existieren und daher weitere Untersuchungen zur Klassifizierung von Hämoplasmen notwendig sind (Hicks et al., 2014).

Innerhalb der Gruppe der Hämoplasmen lassen sich phylogenetisch zwei Untergruppen unterscheiden (Abb. 1):

Die ***Haemominutum-Gruppe*** beinhaltet die Hämoplasmen-Spezies '*Candidatus M. haemominutum*', *M. suis*, *M. wenyonii*, *M. ovis*, '*Candidatus M. haemolamae*' und '*Candidatus M. haemodidiphidis*'. Die Vertreter der „Haemominutum-Gruppe“ kommen bei Katzen, Schweinen, Rindern, Schafen, Alpakas und Opossums vor (Peters et al., 2008).

Die Hauptvertreter der ***Haemofelis-Gruppe*** sind *M. haemofelis*, *M. haemomuris* und *M. haemocanis*, die bei Katzen, Hunden und Mäusen zu vorkommen (Peters et al., 2008).



**Abbildung 1: Phylogenetische Analyse der 16S rRNA-Gensequenz neu beschriebener Hämoplasmaspezies und anderen vorkommenden Hämoplasmaspezies (Steer et al. 2011).**

### 3. *Hämoplasmen als Zoonoseerreger*

In zahlreichen Veröffentlichungen aus China wird von Infektionen mit Hämoplasmen beim Menschen berichtet (Zhuang et al., 2010; Huang et al., 2012). Demnach wurden in verschiedensten Regionen Chinas in einem Zeitraum von 1991 bis 2011 14.951 von 52.433 getesteten Personen positiv auf Hämoplasmen untersucht (Zhuang et al., 2010; Huang et al., 2012). Diese Berichte sind jedoch schwer zu interpretieren, da sie sich noch auf die Auswertung von Blutausstrichen beziehen, welche nach heutigem Kenntnisstand eine geringe Sensitivität und Spezifität aufweisen und keine Rückschlüsse auf die phylogenetische Herkunft zulassen.

Weitere Studien belegten mit Hilfe der PCR-Diagnostik die Übertragung von Mykoplasmen zwischen Mensch und Tier. In Shanghai wurden bei 32 von 65 (49 %) untersuchten Landwirten *M. suis* detektiert (Huang et al., 2012). In den USA konnte bei 9 von 193 untersuchten Patienten mit extensiver Arthropodenexposition und/oder mit häufigem Tierkontakt Hämoplasmen-DNA nachgewiesen werden (Maggi et al., 2013). Im Vergleich dazu waren in einer Versuchsgruppe ohne nennenswerten Tierkontakt, nur 2 von 296 Patienten PCR-positiv für Hämoplasmen (Maggi et al., 2013). In acht der insgesamt 11 positiven Fälle handelte es sich um *M. ovis*, in einem Fall um *M. haematoparvum* (Maggi et al., 2013). Bei den anderen beiden positiven Fällen war keine genaue Charakterisierung des Hämoplasmen-Isolates möglich. *M. ovis* gilt als

wirtsspezifisch für Schafe und *M. haematoparvum* wurde bislang ausschließlich bei Hunden diagnostiziert. Von einem dieser *M. ovis*-positiven Patienten, bei dem es sich um einen 49 - jährigen mexikanischen Tierarzt handelte, existiert ein Fallbericht, laut dem eine Co-Infektion mit *Bartonella henselae* vorlag (Sykes et al., 2010).

Weiterhin berichteten dos Santos et al. (2008) von einem HIV positiven Patienten aus Brasilien, bei dem *M. haemofelis* nachgewiesen wurde. Bosnic et al. (2010) schilderten einen Fall von einer 21 - jährigen Patientin mit systemischen Lupus erythematoses aus Kroatien, bei der man im Blutaussstrich hämoplasmenartige Strukturen an den Erythrozyten fand. Ein weiterer Fallbericht folgte von Steer et al. (2011), von einer 69 - jährigen Frau aus England, mit hämolytischer Anämie und Fieber, bei der mittels PCR-Analyse eine neue hämotrophe Mykoplasmenspezies ('*Candidatus M. haemohominis*') nachgewiesen wurde. Eine Besserung der Symptome konnte durch die Gabe von Tetrazyklinen erreicht werden (Steer et al., 2011).

#### **4. Morphologie und mikrobielle Eigenschaften**

*M. suis* ist ein hämotrophes Bakterium mit einer Größe von 0,3 - 3,0 µm und einer rundlich-ovalen Form (Messick, 2004). Es ist zellwandlos und wird nur von einer Membran begrenzt; einen Zellkern besitzt es nicht (Messick, 2004).

Im Blut infizierter Schweine findet man *M. suis* meistens auf den Erythrozyten, seltener auch frei im Plasma. Die Anheftung (Adhäsion) ist gekennzeichnet durch die Ausbildung von feinen Fibrillen, die einen sehr engen Kontakt zwischen der Wirtszelle Erythrozyt und *M. suis* vermitteln (Zachary und Basgall, 1985). Dieser Prozess der Anheftung ist häufig mit starken deformativen Veränderungen der Erythrozytenmorphologie verbunden (Hoelzle, 2008).

An der Erythrozytenoberfläche lassen sich mindestens drei verschiedene Replikationsformen von *M. suis* beobachten (Zachary und Basgall, 1985). Diese variieren von kleinen und kokkoiden, über diskusförmige zu ringförmigen Formen, je nach Reifungsgrad der Mykoplasmen (Zachary und Basgall, 1985). Groebel et al. (2009) zufolge treten die kleinen kokkoiden Formen in Gruppen an der Erythrozytenoberfläche unmittelbar zum Zeitpunkt der akuten IAP auf, wenn

die Teilungsrate der Mykoplasmen sehr hoch ist. Dementsprechend handelt es sich dabei möglicherweise um junge, unreife Formen von *M. suis*. Neueren Erkenntnissen zufolge, existieren *M. suis*-Isolate, die in der Lage sind, mittels Endozytose-ähnlichen Prozessen Erythrozyten zu invadieren (Groebel et al., 2009). Neben den ursprünglichen Zielzellen, den Erythrozyten, besiedeln diese Isolate auch Zellen des mononuklearen Phagozytosesystems und des Gefäßendothels (Sokoli et al., 2013).

Das Bakterium besitzt ein sehr kleines Genom. Von den zwei bisher sequenzierten Isolaten von *M. suis*, weist das invasive Isolat KI3806 ein Genom von 709 kb (Kilobasenpaaren) und das nicht invasive Isolat Illinois ein Genom von 742 kb auf (Guimaraes et al., 2011a; Oehlerking et al., 2011). Diese sehr kleine Genomgröße ist typisch für das Genus *Mycoplasma* und liegt sehr nahe an der theoretischen Minimalgenomgröße von Bakterien, die gerade noch einen eigenständigen bakteriellen Lebenszyklus mit Selbstreplikation ermöglicht. Auf der anderen Seite steht aber dieses minimalistische Konzept auch für eine starke Adaptation und Abhängigkeit von *M. suis* vom Stoffwechsel seiner Wirtszelle (Hoelzle, 2008; Liu et al., 2012).

## 5. Pathogenese und Immunologie

Die Pathogenese der *M. suis*-Infektionen und ihre zugrunde liegenden Mechanismen sind bei weitem noch nicht aufgeklärt. Der Grund dafür ist v.a. in der Unkultivierbarkeit dieser hämotrophen Bakterien zu finden. Wichtige Daten zur Aufklärung der Pathogenese wurden v.a. aus experimentellen Infektionen von splenektomierten Schweinen gewonnen (Hoelzle, 2008). Zudem wurden durch den Einsatz moderner Methoden wie rekombinante Proteintechniken, Genomsequenzierungen, Proteom- und Immunomanalysen sowie mikroskopischer Methoden (Elektronenmikroskop, Konfokale Laser Scanning Mikroskopie) wichtige Pathomechanismen von *M. suis* beschrieben (Hoelzle et al., 2007c; Groebel et al., 2009; Guimaraes et al., 2011a; Oehlerking et al., 2011; Felder et al., 2012; Sokoli et al., 2013). Die beschriebenen Pathomechanismen lassen sich in vier Kategorien einteilen:

1. Die direkte Schädigung der Erythrozyten und konsekutive Lyse durch die

Adhäsion von *M. suis* an und Invasion in die Zellen (Hoelzle, 2008; Groebel et al., 2009).

2. Die indirekte Schädigung der Erythrozyten: *M. suis* induziert die Bildung von kalt-reaktiven und warm-reaktiven Autoantikörpern, die zu einer Lyse der Erythrozyten (intra- und extravaskulär) und somit zu einer autoimmunen hämolytischen Anämie bzw. Mikrothrombenbildung führen (Hoelzle, 2008; Felder et al., 2011).

3. Schädigung der Erythrozyten durch erhöhten oxidativen Stress, durch Intervention von *M. suis* in den Zellstoffwechsel, und durch Auslösen von apoptotischen Vorgängen (programmierten Zelltod) der Erythrozyten (Eryptose) (Felder et al 2011; Guimaraes et al. 2011).

4. Durch die Besiedlung der Gefäßendothelzellen, kommt es zu einer Aktivierung und Funktionsstörung des Endothels durch *M. suis*, was vermutlich zur Entstehung einer hämorrhagischen Diathese in infizierten Tieren führt (Sokoli et al., 2013).

### **1. Adhäsion/Invasion**

*M. suis* ist durch fibrilläre Strukturen mit der Erythrozytenoberfläche verbunden (Zachary und Basgall, 1985). Wie in Abbildung 2 dargestellt, lassen sich elektronenmikroskopisch an der Zelloberfläche der *M. suis* besiedelten Erythrozyten Eindellungen und Invaginationen erkennen (Zachary und Basgall, 1985; Groebel et al., 2009). Die Adhäsion von *M. suis* an die Zelloberfläche führt demnach zu der direkten Schädigung der Erythrozyten durch mechanische Schädigung der Zellmembran und die damit verbundene Veränderung der osmotischen Verhältnisse. Neben der direkten Schädigung werden die veränderten Erythrozyten vom Immunsystem als körperfremd erkannt, was zu einer Eliminierung durch Makrophagen führt. Die Folge ist eine extravasale Hämolyse die zur Anämie der *M. suis*-infizierten Tiere führt (Heinritzi, 1990b; Messick, 2004). Der enge Kontakt zwischen Erythrozyt und *M. suis* scheint darüber hinaus eine wichtige Voraussetzung für die Replikation des Bakteriums zu sein (Hoelzle, 2008).

Die molekularen Mechanismen, die für eine Adhäsion von *M. suis* an die

Oberfläche der Erythrozyten verantwortlich sind, konnten bislang nicht vollständig aufgeklärt werden. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen weiß man, dass die für viele Mykoplasmen typischen „tip-Organellen“ bei *M. suis* nicht ausgebildet sind (Messick, 2004). Es konnten aber bisher verschiedene oberflächenständige Adhäsionsproteine identifiziert werden: MSG1, HspA1 und die  $\alpha$ -Enolase (Hoelzle et al., 2007c; Hoelzle et al., 2007d; Schreiner et al., 2012). Alle drei Proteine werden während der akuten Phase der IAP gebildet, was in Proteomstudien nachgewiesen wurde (Felder et al., 2012). Werden sie als rekombinante Proteine durch nicht adhärente *E.coli* exprimiert, erhält das Darmbakterium die Eigenschaft an Erythrozyten zu binden (Hoelzle et al., 2007c; Hoelzle et al., 2007d; Schreiner et al., 2012). MSG1 und  $\alpha$ -Enolase sind in ihrer primären Funktion glykolytische Proteine, die als sog. „multitasking“ oder „Moonlighting“ Proteine zusätzliche Funktionen wie die Adhäsion übernehmen (Hoelzle et al., 2007d; Schreiner et al., 2012). MSG1 besitzt als primäre Funktion die einer Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH), die  $\alpha$ -Enolase katalysiert die Umwandlung von 2-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat. Somit sind beide Proteine Schlüsselenzyme der Glykolyse (Hoelzle et al., 2007d; Felder et al., 2012; Schreiner et al., 2012). Die Glykolyse stellt für *M. suis* die einzige Möglichkeit Energie in Form von ATP zu bilden dar (Hoelzle et al., 2011), und ist deshalb essentiell für die Erregervermehrung (Hoelzle, 2008). MSG1,  $\alpha$ -Enolase und HspA1 besitzen darüber hinaus starke immunogene Eigenschaften und induzieren eine spezifische Immunantwort im infizierten Wirtstier (Hoelzle et al., 2007d; Felder et al., 2012; Schreiner et al., 2012).

Lange ging man davon aus, dass *M. suis* sich ausschließlich an der Erythrozytenoberfläche oder frei im Plasma befindet. Groebel et al. (2009) erkannten in raster- und transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen von Blutpräparationen aus infizierten Schweinen, dass *M. suis* auch in der Lage ist in Erythrozyten einzudringen. Die Invasivität von *M. suis* ist ein weiterer Pathomechanismus, der zur Schädigung und zur Zerstörung von Erythrozyten führen kann (Groebl et al., 2009). Bisher wurden mithilfe von Genomsequenzierung noch keine Faktoren gefunden, welche die Invasivität von *M. suis* erklären (Guimaraes et al. 2011). Die Arbeitsgruppe von Groebel et al. (2009) beobachtete weiterhin die Unwirksamkeit von Tetrazyklinen bei den experimentell infizierten Versuchstieren. Es wurden keine Hinweise darauf



gefunden, dass die Oberflächen von invadierten Erythrozyten modifiziert sind, was zu einer Eliminierung durch Makrophagen führen würde. Daher kann angenommen werden, dass die Invasivität eine neue Strategie darstellt einer Therapie bzw. einer Immunantwort des Wirts zu entgehen und damit persistente Infektionen zu etablieren (Groebel et al., 2009).

## 2. Immunpathogenese

Etwa vier Wochen nach der Infektion mit *M. suis* kommt es zu der Bildung von autoreaktiven Kälteagglutininen vom IgM-Typ (Hoelzle, 2008). Diese Kälteagglutinine sind wahrscheinlich gegen Karbohydrat-Antigene auf der Erythrozytenmembran gerichtet (Heinritzi, 1990b). Kälteagglutinine bewirken v.a. in Körperteilen mit niedriger Körpertemperatur (z.B. Ohren) eine Erythrozytenagglutination, die Entstehung von Mikrothromben und somit das klinische Bild einer IAP mit Akrozyanosen und Vaskulationsstörungen. *M. suis* hat zudem offensichtlich immunmodulatorische Eigenschaften, da die Bildung von T-Helferzellen unterdrückt und somit die zellvermittelte Immunantwort geschwächt wird (Zachary und Smith, 1985). In Folge dessen sind *M. suis*-infizierte Schweine anfälliger für andere Infektionskrankheiten (Hoelzle, 2008).

Neben den Kälteagglutininen werden in der akuten Phase der IAP warm-reaktive Autoantikörper vom IgG-Typ gebildet, die sich gegen das  $\alpha$ - und  $\beta$ -Aktin der Erythrozyten richten (Felder et al., 2010). Die mit IgG-Autoantikörpern besetzten Erythrozyten werden von der Milz und anderen retikuloendothelialen Organen gefiltert und von dem mononuklearen Phagozytosesystem eliminiert (Heinritzi, 1990b). Somit führt die Bildung von warmen Autoantikörpern in der frühen Phase der Infektion zur Veränderung der Erythrozyten und der damit verbundenen autoimmunen hämolytischen Anämie (AIHA). Möglicherweise spielt die Bindung des MSG1-Proteins an die Erythrozytenoberfläche eine Rolle für die Induktion dieser Vorgänge (Felder et al., 2010). Durch die Elimination der Erythrozyten und den daran assoziierten Mykoplasmen, findet eine vorübergehende Reduktion der Erregermenge im Blut statt, was den zyklischen Verlauf der Erkrankung begründen könnte (Zachary und Smith, 1985).

### 3. Auswirkungen von *M. suis* auf den Zellstoffwechsel/Eryptose

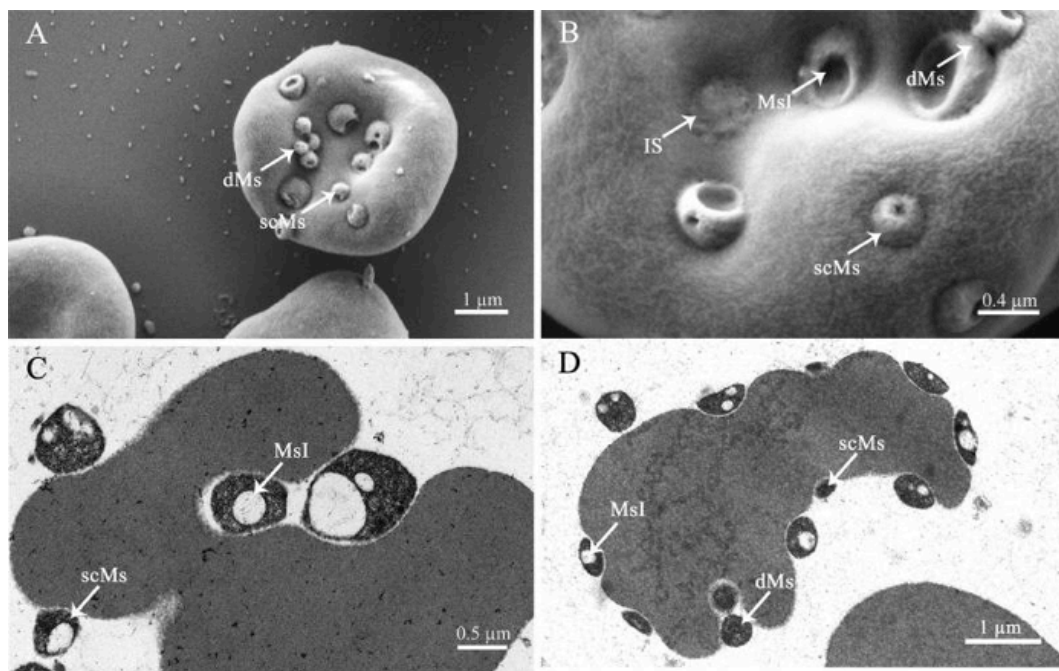
Guimaraes et al. (2011a) vermuteten, dass *M. suis* durch den Entzug von Stoffwechselprodukten, wie Glukose, Inosin, Ribose, Hypoxanthine, Aminosäuren, und NADH/NADPH den oxidativen Stress für die Wirtszelle erhöht, so dass die Lebensspanne der Erythrozyten verkürzt wird. Der Entzug von der wirtseigenen Glukose durch *M. suis* kann bei experimentell infizierten Schweinen zu einer massiven Hypoglykämie führen (Heinritzi, 1990b).

Der oxidative Stress, die direkte Schädigung der Erythrozytenoberfläche durch *M. suis*, sowie die damit verbundenen strukturellen Umlagerungen vom Aktin des Zytoskeletts führen vermutlich zu der Induktion des programmierten Zelltod von Erythrozyten (Eryptose). Der *M. suis*-induzierte programmierte Zelltodes von Erythrozyten wurde durch Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Felder et al. (2011) erkannt. Die Eryptose stellt einem weiteren Pathomechanismus von *M. suis* dar. Eryptose ist durch Zellschrumpfung, Bläschenbildung an der äußeren Membran und die Bildung von Phosphatidylserin gekennzeichnet (Lang et al., 2005). Der genaue Zusammenhang zwischen *M. suis* und dem programmierten Zelltod von Erythrozyten ist noch nicht vollständig geklärt. Die Untersuchungen von Felder et al. (2011) ergaben, dass nach Infektion mit hochvirulenten *M. suis*-Isolaten, die Ausprägung der Eryptose durch andere schwerwiegende Prozesse, wie der autoimmunen Hämolyse überlagert wird. Nach Infektion mit niedrigvirulenten *M. suis*-Isolaten konnte eine hohe Eryptoserate beobachtet werden, die mit einer milden Anämie verknüpft war. Möglicherweise wird durch die Eryptose die Replikation von *M. suis* vermindert, da das Phosphatidylserin an der Erythrozytenoberfläche zur Phagozytose der betroffenen Erythrozyten durch zirkulierende Makrophagen führt und somit die Vermehrungsgrundlage für *M. suis* fehlt.

### 4. Interaktion von *M. suis* mit Endothelzellen

Aktuelle Studien ergaben, dass *M. suis* in Verbindung mit Endothelzellen des Gefäßsystems steht. Elektronenmikroskopischen Untersuchungen zufolge ist *M. suis* einzeln und in Form von biofilmartigen Strukturen auf Gefäßendothelien zu finden (Solkoli et al., 2013). Des Weiteren zeigten *in vitro*-Untersuchungen, dass *M. suis* mit dem Aktin des Zytoskeletts von Endothelzellen interagiert, so

dass es zu der Kondensation des Aktins und zur Aktivierung der Endothelzellen kommt (Sokoli et al., 2013). Das Resultat ist vermutlich eine Gerinnungsaktivierung durch Endothelschädigungen, die sich als hämorrhagische Diathese (Morbus maculosus) klinisch manifestieren kann (Sokoli et al., 2013). Zudem können die Endothelschädigungen eine weitere Ursache für die Mikrothrombosen und die daraus resultierenden Zyanosen an den Ohren und den Gliedmaßen darstellen (Sokoli et al., 2013). Biofilmbildungen stellen, neben der Invasion in die Erythrozyten, einen Schutz vor der Wirkung von Antiinfektiva dar (Sokoli et al., 2013).



**Abbildung 2: Rasterelektronenmikroskopische und transmissions-elektronenmikroskopische Aufnahmen von *M. suis* am Erythrozyten. Es sind verschiedene Reifungsstadien von *M. suis* (dMs, scMs, Msl), Invaginationen der Erythrozytenoberfläche sowie Invasionsnarben (IS) dargestellt (Groebel et al., 2009).**

## 6. Untersuchungen zu invasiven *M. suis*-Stämmen

Das *M. suis*-Isolat KI3808 gehört zu den invasiven *M. suis*-Isolaten (Felder et al., 2011). Die Invasivität geht höchstwahrscheinlich mit einer Steigerung der Virulenz von *M. suis* einher (Hoelzle et al., 2011). Die Invasivität von *M. suis* wurde durch Groebel et al. (2009) mittels raster- und transmissions-elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Blutpräparationen nach experimenteller Infektion mit dem *M. suis*-Isolat 08/07 festgestellt. Die

Arbeitsgruppe von Groebel et al. (2009) beobachtete weiterhin die Unwirksamkeit von Tetrazyklinen bei experimentell infizierten Versuchstieren. Nachdem mithilfe von Microarray-Analysen keine Resistenzgene für Tetrazyklin gefunden werden konnten, wurde die intrazelluläre Lokalisation des Erregers in den Erythrozyten als Ursache für die stark reduzierte Wirksamkeit des Antibiotikums vermutet. Felder et al. (2011) fanden heraus, dass *M. suis* in der Lage ist den programmierten Zelltod von Erythrozyten hervorzurufen. Bei dem Isolat KI3806 scheint dieser Prozess jedoch von untergeordneter Bedeutung zu sein, da andere Mechanismen wie die autoimmune Hämolyse mit ihren Auswirkungen die Eryptosis überlagern (Felder et al., 2011). Das Isolat KI3806 wurde von Oehlerking et al. (2011) vollständig sequenziert. Dabei zeigte sich, dass einige Transportsysteme und Stoffwechselwege fehlen oder unvollständig sind (Oehlerking et al., 2011; Felder et al., 2012). Beispiele dafür sind zum einen der lückenhafte Nukleotidsyntheseapparat und zum anderen die verminderte Produktion von Proteinen für den Fett- und Coenzym A-Stoffwechsel des Bakteriums, obwohl Lipide essentielle Bestandteile von Zellmembranen sind. Ein relativ großer Anteil der Gene kodiert für sogenannte hypothetische Proteine (65-66 %), welche nicht charakterisierbar sind und zum großen Teil nicht während akuten Form der Erkrankung exprimiert werden (Felder et al., 2012). Alle genannten Faktoren lassen auf eine starke Anpassung des Bakteriums an seinen Wirt schließen (Hoelzle et al., 2011). Eine vergleichende Analyse der Genomsequenzen des invasiven *M. suis*-Isolats KI3806 mit den Genomsequenzen des nicht-invasiven *M. suis*-Isolats „Illinois“ ergab keine Hinweise, welche Strukturen und Mechanismen für die *M. suis*-Invasivität verantwortlich sein könnten (Guimaraes et al., 2011a; Felder et al., 2012).

## 7. Klinisches Bild

Bei der IAP handelt es sich um eine Faktorenkrankheit (Heinritzi, 1990b). Unter natürlichen Bedingungen können infizierte Tiere über Monate klinisch unauffällig bleiben bis erste Symptome auftreten (Hoelzle, 2008). Abhängig von der Kondition der Tiere, der Infektionsdosis und dem Stress, dem die Tiere ausgesetzt sind, kann die Inkubationszeit stark variieren (Hoelzle, 2008). Stressfaktoren, die einen Krankheitsausbruch begünstigen, stellen z.B. Co-

Infektionen mit anderen Krankheitserregern, Belastung durch Umstallen, Futterumstellungen, schlechte Haltungsbedingungen sowie Stress infolge der Geburt oder des Absetzens dar (Heinritzi, 1990b). Die beschriebenen klinischen Symptome sind insbesondere bei Einzeltieren vorzufinden (Bollwahn, 1982, Heinritzi, 1990b).

Werden splenektomierte Schweine infiziert, verkürzt sich die Inkubation auf eine Zeitspanne von 6 - 14 Tagen (Splitter und Williamson, 1950; Heinritzi, 1990b). Diese Tiere entwickeln in der Regel die akute Verlaufsform der IAP, welche von der chronischen Form zu unterscheiden ist (Heinritzi, 1990b).

Die klinischen Symptome unterscheiden sich in den verschiedenen Altersklassen der betroffenen Tiere (Heinritzi, 1990b; Hoelzle, 2008). Saugferkel fallen durch Saugunlust, Blässe und geringgradigem Ikterus auf. Zudem bleiben sie in ihrer Entwicklung zurück und sind anfälliger für andere Krankheitserreger (Bugnowski et al., 1986). Aufgrund der hochgradigen Anämie kann es zu plötzlichen Todesfällen kommen (Hoelzle, 2008).

Heinritzi (1990b) beschreibt für Absetzferkel, Läufer und Mastschweine eine Symptomatik mit Ikteroanämie, geringeren Gewichtszunahmen, struppigem Haarkleid, Inappetenz, Fieber bis zu 42 °C und Dyspnoe. Außerdem können zyanotische Veränderungen an den Akren auftreten (Heinritzi, 1990b).

Bei Sauen können peripartal Krankheitserscheinungen durch *M. suis* auftreten. Diese sind laut Heinritzi (1990b) durch Anorexie, Fieber bis 41,7 °C, Vulva- und Gesäugeödem sowie stagnierendem Milchfluss gekennzeichnet. Weiterhin können die Tiere ikterische Skleren aufweisen. Schweighardt et al. (1986), Brownback (1981) und Strait et al. (2012) berichteten zudem von Auswirkungen auf das Reproduktionsgeschehen mit vermehrtem zyklischem Umrauschen, Fruchtbarkeitsstörungen, Dysgalaktie und verminderten Wurfgrößen, bis hin zu Aborten und der Geburt von Mumien (Schweighardt et al., 1986; Messick, 2004).

Die chronische Verlaufsform zeichnet sich neben Blässe und Kümern durch allergische Hautreaktionen vom Bild einer Urtikaria aus (Heinritzi 1990b). Diese als Morbus maculosus bezeichneten Hautveränderungen manifestieren sich besonders am Bauch. Es können auch die Ohren und die Gliedmaßen davon betroffen sein (Bugnowski et al. 1986; Heinritzi 1990b). Darüber hinaus begünstigt die IAP durch Suppression des Immunsystems Infektionen mit anderen

Krankheitserregern, die zu respiratorischen und enteralen Krankheiten führen (Zachary und Smith, 1985).

Die individuelle Empfänglichkeit von Schweinen für hämotrophe Mykoplasmen sowie der Immunstatus der Tiere werden als Ursache für die Entwicklung von chronischen Infektionen diskutiert (Messick, 2004).

## **8. Übertragung von *M. suis***

Da *M. suis* zu den hämotrophen Mykoplasmen gehört, findet die Übertragung in erster Linie über den Blutweg statt (Henry, 1979). Die Infektion kann über kontaminierte Kanülen oder über Gerätschaften im Rahmen von zootechnischen Eingriffe erfolgen (Henry, 1979). Auch Insekten wird eine Rolle als Vektoren zugeschrieben. Hierbei wäre sowohl die Schweinelaus *Hämatopinus suis* (Messick, 2004), als auch die Räude milbe *Sarcoptes scabiei suis* zu erwähnen (Heinritzi, 1990b). Experimentell wurde die intravenöse, intramuskuläre, subkutane, intraperitoneale und orale Übertragung von *M. suis* mit erregerehaltigem Blut beschrieben (Hoelzle, 2008).

Weiterhin wird die intrauterine Übertragung als Infektionsursache für neugeborene Ferkel diskutiert (Henderson et al., 1997).

Eine Infektion über den Harn findet nur dann statt, wenn dieser Blutbeimengungen enthält (Heinritzi, 1990b).

Subklinisch und chronisch infizierte Trägerschweine, die klinisch im Bestand nicht auffällig sind bzw. neu eingestallt werden, sind von besonderer Bedeutung in Bezug auf die Übertragung von *M. suis* innerhalb von Beständen bzw. die Einschleppung in die Bestände (Hoelzle, 2008).

## **9. Diagnostik**

### **9.1. Klinische Diagnose**

Laut Heinritzi (1990b) kann eine klinische Diagnose nur zum Zeitpunkt einer akuten IAP stattfinden, da dann signifikante klinische Symptome wie Fieber, Blässe und Apathie beobachtet werden können. Weiterhin können Ikterus,

Anorexie, Zyanosen an Ohren und Gliedmaßen sowie allergische Hautveränderungen auftreten (Heinritzi, 1990b).

Sauen zeigen vorwiegend kurz vor der Geburt Symptome der IAP, was negative Auswirkungen auf das Reproduktionsgeschehen zur Folge haben kann (Schweighardt et al., 1986; Messick, 2004).

Eine chronische IAP ist durch unspezifische Symptome gekennzeichnet, wodurch die klinische Diagnose deutlich erschwert wird. Bei chronischen *M. suis*-Infektion variiert das klinische Bild von einer asymptomatischen Infektion bis hin zu unterschiedlichen Krankheitszeichen mit Blässe, mildem Ikterus und Lebensschwäche bei Saugferkeln, Wachstumseinbußen in der Mast sowie Reproduktionsstörungen bei Sauen (Henry, 1979; Brownback, 1981; Zinn et al., 1983; Schweighardt et al., 1986).

## **9.2. Hämatologische Veränderungen**

Die IAP zeigt sich hämatologisch als Ikteroanämie mit Veränderungen der Blutwerte. Bei einer akuten IAP findet man einen parallelen Abfall der Erythrozytenzahl, der Hämoglobinkonzentration und des Hämatokrit-Werts (Heinritzi, 1990b). MCH-, MCV- und MCHC-Werte weichen nicht vom Referenzbereich ab. Es zeigt sich das typische Bild einer normochromen normozytären Anämie (Heinritzi, 1990b). Des Weiteren kann kurz vor bzw. kurz nach einer akuten IAP eine neutrophile Leukozytose auftreten (Heinritzi, 1990b). Bei einer chronischen Erkrankung sind die hämatologischen Veränderungen weniger stark ausgeprägt (Heinritzi, 1990b).

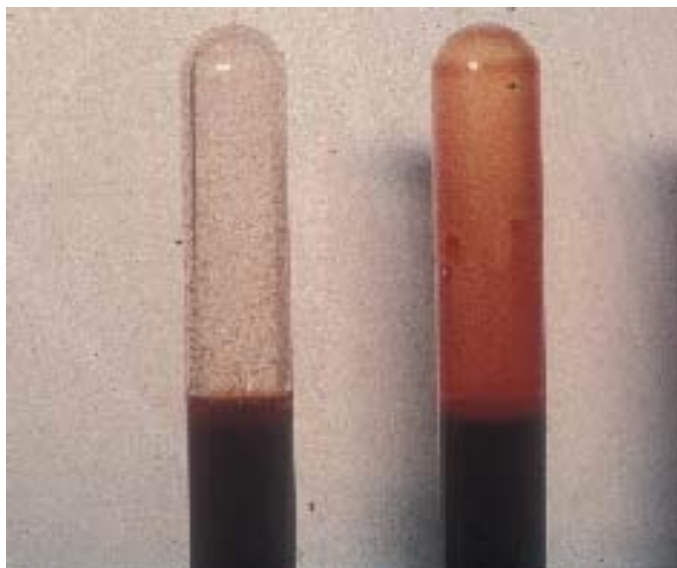
Die Blutglukosewerte erreichen bei einer akuten Verlaufsform Werte von unter 10 mg/dl, was mit dem erhöhten Glukoseverbrauch von *M. suis* zu begründen ist (Heinritzi, 1990b). Die Bilirubinkonzentration steigt durch die erregervermittelte Zerstörung der Erythrozyten an, da die im Blut anfallende Bilirubinmenge zu hoch ist, um in der Leber weiterverarbeitet zu werden (Heinritzi, 1990b). Es kann ein Laktatanstieg mit der Folge einer Blutazidose mit negativer Basenabweichung auftreten (Heinritzi, 1990b). Auch das Serumeisen kann erhöht sein (Heinritzi, 1990b).

Heinritzi (1990b) berichtete außerdem von einer verlängerten Thromboplastin-

und Prothrombinzeit und einer Verminderung der Thrombozytenzahl. Aufgrund einer intravasalen Gerinnung mit anschließender Verbrauchskoagulopathie fällt eine erhöhte Blutungsneigung bei Tieren mit einer *M. suis*-Infektion auf (Heinritzi, 1990b).

Bei der chronischen Verlaufsform der IAP können bei den Parametern Leukozytenzahl, Thrombozyten und Eisen keine signifikante Unterschiede zwischen infizierten und gesunden Tieren festgestellt werden (Grimm et al., 2008).

Morphologische Veränderungen des Blutes sind in Form von feingriesligen Spontanagglutinationen zu beobachten (Heinritzi, 1990b). Das Blut haftet nach der Abkühlung auf Raumtemperatur an der Wand des Reagenzglases (Heinritzi, 1990b) (Abb. 3). Diese Mikroagglutination verschwindet wieder, wenn das Blut auf 37 °C erwärmt wird (Heinritzi, 1990b). Die Ursache hierfür ist das Auftreten von Kälteagglutininen (Heinritzi, 1990b). Weiterhin ist eine deutliche ikterische Veränderung des Blutplasmas zu erkennen (Heinritzi, 1990b).



**Abbildung 3: Mikroagglutination an der Wand eines Reagenzglases im Vergleich zu dem Blut eines gesunden Tieres (Bild: Heinritzi)**

### **9.3. Biologische Diagnose**

Lange Zeit galt die Splenektomie als Goldstandard der *M. suis*-Diagnostik, da mit dieser Methode auch subklinisch infizierte Tiere erfasst werden können (Grimm et al., 2008). Nach der Splenektomie ist innerhalb von 6 - 14 Tagen mit einem sich klinisch manifestierenden eperythrozoonotischen Anfall (akute IAP) des

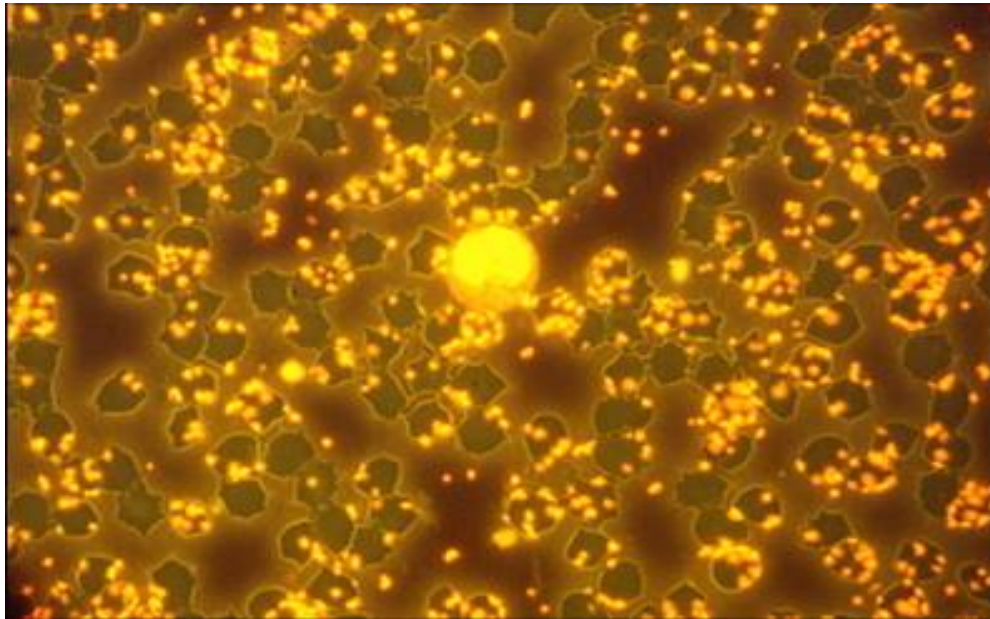


splenektomierten Tieres zu rechnen, wenn dieses tatsächlich *M. suis*-infiziert ist (Heinritzi, 1989). Es ist ebenfalls möglich die Splenektomie bei einem gesunden Schwein durchzuführen, welches anschließend mit dem Blut eines vermutlich IAP-erkrankten Schweins infiziert wird.

Durch die Entfernung der Milz kommt es zu einer massenhaften Vermehrung der Mykoplasmen da die Filterfunktion der Milz, dem größten lymphoretikulären Organ im Körper, entfällt (Heinritzi, 1990b). Zusätzlich kann das Blut des Tieres mikroskopisch auf *M. suis* untersucht werden (Heinritzi, 1990b).

#### **9.4. Mikroskopischer Erregernachweis**

Für den direkten mikroskopischen Erregernachweis im Blutausschlag ist neben der Giemsa-Färbung vor allem die Akridinorangefärbung geeignet. Zur Vermeidung der Agglomeration der Erythrozyten durch Kälteagglutinine wird eine Erwärmung des Blutes auf 38 °C vor der Anfertigung des Ausstrichs empfohlen (Heinritzi, 1990a). Bei der Akridinorangefärbung ist *M. suis* als oranges rundes Gebilde am Rand der grün-gefärbten Erythrozyten sowie frei im Plasma zu finden (Heinritzi, 1990b) (Abb. 4). Diese kostengünstige und leicht durchführbare Methode ist in Verbindung mit der biologischen Untersuchungsmethode zuverlässig, da beim splenektomierten Schwein mit einer akuten IAP zahlreiche Erreger im Blut zu finden sind. Sie ist aufgrund ihrer geringen Spezifität und Sensitivität weniger zur Untersuchung chronisch erkrankter Tiere mit geringen Erregermengen im Blut geeignet (Heinritzi, 1990b). Ein zuverlässiger mikroskopischer Nachweis ist ab einer Erregermenge von  $10^5$  *M. suis*/ml Blut möglich (Grimm et al., 2008; Ritzmann et al., 2009). Die mikroskopische Untersuchung setzt sehr viel Erfahrung des Untersuchers voraus, um die Gefahr von falsch-positiven Ergebnissen z. B. aufgrund der Verwechslung mit Howel-Jolly-Körperchen zu reduzieren. Mit der Giemsa-Färbung sind die Mykoplasmen bei der chronischen Form der IAP nur schlecht von der Erythrozytenwand abgrenzbar (Heinritzi, 1990b). Aus diesem Grund ist die Akridinorangefärbung der Giemsa-Färbung vorzuziehen (Heinritzi, 1990b).



**Abbildung 4: Akridinorange-gefärbter Ausstrich Blutausstrich während einer akuten IAP. Vergrößerung 100-fach. (Bild: Heinritzi)**

#### **9.5. Pathomorphologische und pathohistologische Veränderungen**

Die pathomorphologischen und pathohistologischen Befunde einer akuten IAP sind durch Anämie und Ikterus gekennzeichnet, die besonders deutlich an der Gefäßintima, Leber und Nierenpapille in Erscheinung treten (Doyle, 1932; Bugnowski et al., 1986). In Lunge, Herz und Nieren sind Hämorrhagien zu finden; Milz und Leber können hochgradig vergrößert sein (Doyle, 1932; Bugnowski et al., 1986). Die Leber kann zudem herdförmige bis generalisierte Aufhellungen aufweisen, die durch zentrolobuläre Nekrosen begründet sind. (Doyle, 1932; Bugnowski et al., 1986). Weiterhin werden Aszites, Hydrothorax und geschwollene, ödematöse Lymphknoten beschrieben, die in Einzelfällen marmoriert erscheinen (Doyle, 1932; Bugnowski et al., 1986). Selten wird von hochgradigen hämorrhagischen Diathesen an der Haut und an verschiedenen Organen berichtet (Doyle, 1932; Bugnowski et al., 1986). Histologisch können neben den Lebernekrosen, Hämosiderosen in den Kupfferschen Sternzellen, den Mesangiumzellen der Nierentubuli und in den Retikulumzellen der Milzpulpa auftreten (Doyle, 1932; Bugnowski et al., 1986). Das Knochenmark weist Anzeichen einer hochgradigen Erythropoese auf (Doyle, 1932; Bugnowski et al., 1986).

### 9.6. Molekularbiologischer Erregernachweis

PCR-Methoden (konventionell und quantitativ) stellen eine Diagnostikmöglichkeit mit einer guten Sensitivität und Spezifität bei allen Verlaufsformen der Erkrankung dar (Hoelzle et al., 2007b). Bei der konventionellen PCR wurden unterschiedliche Genabschnitte des Erregers amplifiziert, die auf der 16S rDNA (Messick et al., 2000), dem *rpoB*-Gen (Gwaltney et al., 1993; Gwaltney und Oberst, 1994) oder dem 1.8 kb „genomic fragment“ (Hoelzle et al., 2003) basieren.

Quantitative real-time PCR-Methoden zum spezifischen Nachweis von *M. suis* erreichen die höchste Sensitivität und Spezifität und ermöglichen zudem eine quantitative Aussage über die Erregermenge im Blut. Die bislang beschriebenen quantitativen PCRs basieren entweder auf dem *msg1*-Gen (Hoelzle et al., 2007b) oder der 16S rDNA (Guimaraes et al., 2011b; Watanabe et al., 2012). Als Untersuchungsmaterial eignet sich neben EDTA Blut und Serum auch Organmaterial in dem *M. suis*-DNA durch spezifische Amplifikation nachgewiesen wird (Hoelzle et al., 2007b). Real-time PCR Methoden sind aufgrund ihres geschlossenen Systems weniger anfällig für Kreuzkontaminationen (Grimm et al., 2008). Sie stellen eine sichere Methode für die Routinediagnostik zur Detektion von *M. suis* dar, auch bei Tieren mit geringen Erregermengen im Blut (Grimm et al., 2008).

### 9.7. Serologische Nachweisverfahren

Seit der Entdeckung von *M. suis* wurden verschiedene Vollantigen-Testsysteme entwickelt, wie die Komplementbindungsreaktion (KBR) (Schuller et al., 1990) der indirekter Hämagglutinationstest (IHA) (Watanabe et al., 2012) und der Vollantigen-ELISA (Schuller et al., 1990; Hsu et al., 1992). Da *M. suis* bisher nicht kultivierbar ist, wurden Testantigene aus dem Blut von splenektomierten und experimentell infizierten Schweine gewonnen (Hoelzle et al., 2007a). In Folge dessen enthalten diese Testantigene Bestandteile des Schweinebluts wie z.B. Immunglobuline. Diese Blutbestandteile führen aufgrund ihrer Reaktivität mit den konjugierten Sekundärantikörpern (anti-Schwein-IgG) zu einer verringerten Spezifität des Nachweisverfahrens (Hoelzle et al., 2006). Eine signifikante Verbesserung der Spezifität und Sensitivität der serologischen

Diagnostik konnte durch die Etablierung von rekombinanten Testsystemen erreicht werden (Hoelzle et al., 2007a).

Die Möglichkeit der Herstellung eines rekombinanten ELISA wurde von der Arbeitsgruppe von Zhang et al. (2012) aufgegriffen und mit der Etablierung eines Blocking-ELISAs weiterentwickelt, bei dem monoklonale Antikörper gegen das rekombinante MSG1-Protein verwendet werden. Eine Steigerung der Spezifität des ELISA konnte jedoch nicht erzielt werden.

Aktuell wurde die Etablierung eines „Multiplex Microbead immunoassay (MIA)“ beschrieben, der auf dem Einsatz rekombinanter, immunogener Proteine (i.e. dem Hitzeschockprotein GrpE, der NAD-abhängigen Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase GAPN, und einem Vertreter der paralogen Gen-Familie PGF) beruht (Guimaraes et al., 2014) basiert. Dieses Verfahren ermöglicht den hochspezifischen und sensitiven Nachweis von anti-*M. suis*-Antikörpern (Guimaraes et al., 2014).

## 10. Therapie und Prophylaxe

Für die Behandlung der IAP ist die parenterale Behandlung mit Oxytetracyclin in einer Dosierung von 20 - 30 mg/kg KGW über 7 - 10 Tage nach wie vor das Mittel der Wahl (Heinritzi, 1990b). Bei den meisten *M. suis*-Infektionen mit nicht-invasiven Isolaten ist innerhalb kürzester Zeit eine Verbesserung der klinischen Symptome zu erwarten (Heinritzi, 1990b; Groebel et al., 2009). Eine vollständige Erregereliminierung wird auf diese Weise jedoch nicht erreicht (Heinritzi, 1990b; Hoelzle, 2011). Bei Saugferkeln mit einer erregerbedingten Hypoglykämie sollte zusätzlich Glukose substituiert werden (Bugnowski et al., 1986).

Vorangegangene Studien ergaben keine Verbesserung der klinischen Symptomatik bei invasiven *M. suis*-Isolaten nach Behandlung mit Oxytetracyclinen (Groebel et al., 2009). Folglich ist der Therapieerfolg von den Eigenschaften des jeweiligen *M. suis*-Isolats abhängig (Hoelzle et al., 2009).

Um einer Verschleppung des Erregers über blutkontaminierte Gegenstände vorzubeugen sind konsequente Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen bei zootechnischen Eingriffen durchzuführen. Darüber hinaus ist die Verwendung von Einmalkanülen empfehlenswert (Hoelze, 2008). Eine konsequente

Schädlingsbekämpfung, trägt dazu bei, die Übertragung über blutsaugende Insekten zu reduzieren (Hoelzle, 2008).

Da es sich bei *M. suis* um eine Faktorenerkrankung handelt, ist das gesamte Betriebsmanagement wichtig. Insbesondere sollten haltungsbedingte Stressfaktoren ermittelt und reduziert werden (Heinritzi, 1990b).

Ein Impfstoff zur Prophylaxe der IAP steht derzeit nicht zur Verfügung (Hoelzle et al., 2009). Die Herstellung einer Vakzine wird in erster Linie dadurch erschwert, dass *M. suis* nicht kultivierbar ist. Der Versuch einen Subunit-Impfstoff mit dem rekombinant hergestellten MSG1-Protein von *M. suis* zu entwickeln führte zu keiner belastbaren Immunantwort (Hoelzle et al., 2009).

## 11. Verbreitung von *M. suis*

Zahlreichen Publikationen zufolge kommt *M. suis* weltweit vor. Es liegen Berichte über *M. suis*-Infektionen aus Nord- und Südamerika, Asien (China und Japan), und Europa (Deutschland, Schweiz, Belgien, skandinavische Länder) vor (Messick, 2004; Hoelzle, 2008; Biondo et al., 2009; Watanabe et al., 2012). Dennoch gibt es nur wenige Studien zur tatsächlichen Prävalenz innerhalb der Schweinepopulation.

Mit Etablierung der PCR-Diagnostik für *M. suis* wurden in Shanghai, Brasilien, Japan und Deutschland *M. suis*-Prävalenzen auf Einzeltierebene von 86 %, 18,2 %, 13,9 % und 5 % ermittelt (Biondo et al., 2009; Ritzmann et al., 2009; Yuan et al., 2009; Watanabe et al., 2012). In Deutschland wurde in insgesamt 96 untersuchten Betrieben bei 40,8 % *M. suis*-DNA bei einer Einzeltierprävalenz von 13,9 % nachgewiesen (Ritzmann et al., 2009). In Bayern ist deutschlandweit die höchste Einzeltierprävalenz mit 20 % zu finden und Niedersachsen weist mit 48 % die meisten Betriebe mit einem positiven *M. suis*-Status auf (Ritzmann et al., 2009).

Außerdem wurde ein Wildschweinreservoir für *M. suis* nachgewiesen (Hoelzle et al., 2010). Von 359 in Südwestdeutschland erlegten Wildschweinen, waren 36 Tiere (10,03 %) in der PCR positiv (Hoelzle et al., 2010). Sequenzanalysen ergaben die höchsten Homologien zu den bekannten *M. suis*-Isolaten „Illinois“ (USA) und „Guandong“ (China) (Hoelzle et al., 2010).

### **III. MATERIAL UND METHODEN**

#### **1. Durchführung des Tierversuchs**

##### **1.1. Genehmigung des Tierversuchsvorhabens**

Die Genehmigung des Tierversuchsvorhabens wurde gemäß § 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes bei der Regierung von Oberbayern beantragt und am 30.08.2012 erteilt. Das Versuchsvorhaben wird unter dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2532-87-12 geführt.

##### **1.2. Versuchstiere**

Die Untersuchungen wurden an der Klinik für Schweine der Ludwig-Maximilians-Universität München in Oberschleißheim an insgesamt 17 Versuchstieren durchgeführt. Die Masthybriden stammten von Sauen aus der Lehr- und Versuchsstation der Technischen Universität Weihenstephan, Thalhausen.

Die Tiere wurden im Alter von 28 Tagen und einem Absetzgewicht von über 7,0 kg in die Klinik für Schweine eingestallt. Bis zum Zeitpunkt der Splenektomie wurden die Tiere in Gruppenhaltung auf planbefestigten Boden gehalten. Die Stallungen waren mit Stroheinstreu und Nippeltränken für die ad libitum Wasserversorgung versehen. Die Fütterung erfolgte zweimal täglich mit einem pelletierten Ferkel- bzw. Vormastfutter (Fa. Zimmererwerke, Landshut). Die Temperatur im Stall betrug 16 - 18 °C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 – 70 %. Zudem waren Wärmelampen für die Tiere installiert. Die Tiere hatten jederzeit Zugang zu Beschäftigungsmaterial wie Kanistern, Ketten und Bällen. Es wurde eine einwöchige Eingewöhnungszeit an die neue Umgebung für die Ferkel festgelegt.

Zum Ausschluss einer bereits bestehenden *M. suis*-Infektion wurden am Tag nach der Einstellung von allen Tieren Blutproben entnommen und mittels LightCycler<sup>®</sup> MSG1-PCR und ELISA auf *M. suis* untersucht. In den Versuch wurden nur *M. suis*-negative Schweine eingeschlossen.

### 1.3. Vorversuch

Der Vorversuch diente zur Gewinnung von *M. suis*-haltigem Blut in ausreichender Menge und gleicher Qualität für die Infektion der Tiere im Hauptversuch. Dazu wurden drei Tiere im Alter von 36 Tagen splenektomiert und eine Woche nach der Splenektomie mit 1 ml *M. suis*-haltigem EDTA-Blut ( $10^8$  *M. suis*/ml Blut) infiziert. Das Blut für den Vorversuch stammte aus dem Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik der Universität Hohenheim. Das Blut für den Hauptversuch wurde zum Zeitpunkt der maximalen Bakteriämie, bestätigt durch die mikroskopische Untersuchung von Akridinorange-gefärbten Blutaussstrichen (> 80 % der Erythrozyten mit *M. suis* infiziert), entnommen. Die Blutentnahme erfolgte unter Isoflurannarkose (Isoba<sup>®</sup>, MAC ca 1,5 Vol %, MSD Tiergesundheit, Unterschleißheim) aus der V. cava cranialis. Anschließend wurden die Tiere euthanasiert. Nach Quantifizierung von *M. suis* mithilfe der LightCycler<sup>®</sup> MSG1-PCR wurde das gewonnene Blut bei -70 °C für die spätere Infektion der Tiere des Hauptversuchs aufbewahrt.

### 1.4. Hauptversuch

#### 1.4.1. Versuchsablauf im Überblick

Der Hauptversuch wurde in zwei Versuchsgruppen zu jeweils sieben Tieren durchgeführt. Die sieben Tiere der Gruppe A wurden nach einer Eingewöhnungszeit von einer Woche splenektomiert. Die restlichen sieben Tiere wurden nicht splenektomiert (Gruppe B). Ab dem Zeitpunkt der Splenektomie von Gruppe A wurden die Tiere beider Versuchsgruppen in Einzelboxen untergebracht.

Eine Woche nach der Operation der Gruppe A wurden die Tiere beider Gruppen infiziert (Versuchstag 0). Nach der Infektion erfolgte täglich eine klinische Untersuchung. Im Abstand von zwei Tagen wurde bei allen Tieren der beiden Versuchsgruppen EDTA-Blut und Serum gewonnen. Ab 10 Tage p.i. erfolgte die Blutprobenentnahme einmal wöchentlich. In den ersten acht Versuchstagen wurden im Abstand von zwei Tagen bei allen 14 Tieren Vaginal-, Speichel-, und Nasentupfer sowie Spontanurin und Kotproben entnommen. Die Proben wurden auf das Vorhandensein von *M. suis* - DNA mittels LightCycler<sup>®</sup> MSG1 - PCR untersucht.

Am 83. Versuchstag fand die Euthanasie der Tiere mit Release<sup>®</sup> (WdT-Wissenschaftsgenossenschaft Deutscher Tierärzte eG, Garbsen, 450 mg/5 kg bis 30 kg KGW) statt.

**Tabelle 1: Versuchsablauf**

	<i><b>Gruppe A (n=7)</b></i>	<i><b>Gruppe B (n=7)</b></i>
	<i>splenektomiert</i>	<i>nicht splenektomiert</i>
<b>Tag 0</b>	Infektion	
<b>Tag 1</b>	Klinische Untersuchung	
<b>Tag 2-8</b>	Blutprobenentnahme, Tupferproben, Spontanurin und Kot alle zwei Tage Klinische Untersuchung täglich	
<b>Tag 9-82</b>	Blutprobenentnahme wöchentlich Klinische Untersuchung täglich	
<b>Tag 83</b>	Euthanasie	

#### **1.4.2. Durchführung der Splenektomie**

Nach der einwöchigen Eingewöhnungszeit wurden sieben Tiere gemäß der Methode nach Heinritzi (1984) splenektomiert. Die Narkose wurde mit Azaperon (Stresnil<sup>®</sup>, 2 mg/kg KGW, Fa. Janssen-Cilag GmbH, Neuss) und Ketamin (Urostamin<sup>®</sup>, 10 - 25 mg/kg KGW, Fa. Serumwerk-Bernburg AG) intravenös eingeleitet. Für die Narkoseaufrechterhaltung wurde Isofluran (Isoba<sup>®</sup>, MAC ca. 1,5 Vol%, MSD Tiergesundheit, Unterschleißheim) verwendet. Um die operativen und postoperativen Schmerzen zu reduzieren, erhielten die Tiere Meloxicam (Metacam 5%<sup>®</sup>, 0,4 mg/kg KGW entspricht 2 ml/25 kg KGW, Boehringer Ingelheim) und Metamizol (Vetalgin<sup>®</sup>, 15 - 20 mg/kg KGW entspricht 0,3 - 1 ml/10 kg KGW, MSD Tiergesundheit, Unterschleißheim) intramuskulär. Die



Applikation von Metamizol erfolgte einmal täglich innerhalb der ersten zwei Tage nach der Operation. Als Antibiose zur Vorbeugung von Wundinfektionen wurde den Tieren bis zum dritten Tag nach der Operation Penicillin (Vetri-Proc® 30 % CEVA Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf 1 ml/10 kg KGW) intramuskulär verabreicht. Die Tiere wurden in rechter Seitenlage fixiert um anschließend die linke Flankengegend zu rasieren, zu säubern und zu desinfizieren. Das Operationsfeld wurde mit einer sterilen Folie abgedeckt. Es erfolgte der Hautschnitt mit einer Länge von 10 cm 1 - 2 cm fingerbreit hinter dem letzten Rippenbogen. Nach der Durchtrennung der Faszien und der Bauchmuskeln, wurde unter Fingerschutz das Peritoneum eröffnet. Die Milz wurde mit den Fingern unter dem letzten Rippenbogen aufgesucht und der ventrale Milzpol durch die Laparotomiewunde vorverlagert, sodass das Ligamentum gastrolienale und die darin verlaufenden Gefäße (A. und V. gastroepiploica) sichtbar wurden. Es erfolgte die stumpfe Durchtrennung des Bandes und die doppelte Ligatur der Gefäße mit einem nicht resorbierbaren Faden. Dann wurde der Schlingenführer nach Heinritzi (1984) über die Facies visceralis zum dorsalen Milzpol bis hin zum Ansatz des großen Netzes geführt. An dieser Stelle erfolgte die Ligatur. Anschließend wurde der Schlingenführer über die Facies parietalis zurückgezogen, wobei der nicht resorbierbare Faden hinter den Gefäßen des dorsalen Milzpol (A. und V. lienalis) liegen blieb. Somit konnte die dreifache Verknotung von außen erfolgen. Die Gefäße wurden mit einer gebogenen Schere nach Metzenbaum durchtrennt. Es wurde sichergestellt, dass es zu keinen Nachblutungen kam bevor das Peritoneum mit einer fortlaufenden Naht verschlossen wurde. Der Verschluss der Muskelschichten erfolgte mittels sultanschen Diagonalheften. Als Hautnaht wurde die modifizierte Donati-Naht gewählt. Die Fäden der Hautwunde wurden nach 10 Tagen wieder gezogen.

#### **1.4.3. Infektion**

Die Infektion der Versuchstiere erfolgte am Versuchstag 0 mit dem hochvirulenten *M. suis*-Isolat KI3806 (Oehlerking et al., 2011). Den Tieren wurde jeweils 2 ml EDTA-Blut mit einer Erregermenge von  $10^8$  *M. suis*/ml Blut subkutan injiziert. Es folgte eine prophylaktische Applikation von 1 ml Penicillin (Vetriproc 30 %®, CEVA Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf) intramuskulär über drei Tage.

#### **1.4.4. Klinische Untersuchung**

Die klinische Untersuchung der Tiere erfolgte täglich. Die Untersuchungsergebnisse wurden anhand eines definierten Bewertungsschemas („Score-Systems“) dokumentiert und beurteilt (Tabelle 2). Ab dem Erreichen von insgesamt drei Score-Punkten pro Tag und/oder einem Hämatokrit von  $< 25 \%$  bzw. einer Hypoglykämie (Blutglukose  $< 3 \text{ mmol/l}$ ) wurde eine Behandlung mit Oxytetracyclin (Terramycin/ LA<sup>®</sup> 20 mg/kg KGW, Zoetis Deutschland GmbH) (40 mg/kg KGW) und Glukose (Ursolyt G oral<sup>®</sup>, 35 g/l Trinkwasser, Serumwerk Bernburg AG) eingeleitet. Tiere die fünf Score-Punkte erreichten bzw. eine hochgradige Anämie (Hämatokrit  $< 18 \%$ ) und Hypoglykämie ( $\leq 1 \text{ mmol/l}$ ) aufwiesen, wurden euthanasiert.

**Tabelle 2: Bewertungsschema („Score-System“) für die klinische Untersuchung**

<i><b>Organ</b></i>	<i><b>Score-Punkte</b></i>	<i><b>Symptom</b></i>
Ohrträder	0	keine Veränderungen
	1	geringgradige Zyanosen
	2	moderate Zyanosen bzw. Nekrosen
Haut	0	keine Veränderungen
	1	moderate Blässe
	2	Morbus maculosus
	3	Ikterus
Temperatur	0	< 40°C
	1	40 - 42°C
	2	> 42°C
Verhalten	0	ungestört
	1	reduziert
	2	Apathie
Futteraufnahme	0	keine Veränderungen
	1	reduzierte Futteraufnahme
	2	Anorexie
Atmung	0	keine Veränderungen
	1	milde Dyspnoe
	2	starke Dyspnoe

#### **1.4.5. Probengewinnung**

Zwei Tage vor der Infektion sowie an den Versuchstagen 2, 4, 6, 8, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77 und 83 p.i. wurde den Tieren EDTA Blut und Serum entnommen. Zur Blutgewinnung wurden die Tiere bis zu einem Gewicht von ca. 25 - 30 kg auf dem Rücken fixiert und die Vena jugularis dexter punktiert. Hierzu wurden EDTA-Monovetten bzw. Serummonovetten (Primavette® V, Fa. KABE Labortechnik, Nürnberg-Elsenroth) mit aufgesetzten Einmalkanülen von 1,10 x 50 mm Länge (Sterican®, Braun, Melsungen) verwendet. Ab einem Gewicht von 30 kg wurden die Tiere zur Blutentnahme in der Oberkieferschlinge fixiert und die Kanülenmaße auf 1,20 x 75 mm angepasst.

Die Entnahme der Vaginal-, Speichel-, und Nasentupfern erfolgte zwei Tage vor der Infektion und an den Tagen 2, 4, 6, 8 p.i. jeweils vor der Blutprobenentnahme, um eine Blutkontamination der Tupferproben zu vermeiden. Die Tupfer wurden anschließend in sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Wesseling) aufbewahrt.

Die Kotproben wurden durch das Aufsammeln von frisch abgesetztem Kot gewonnen. Die Entnahme der Urinproben erfolgte durch das Auffangen von spontan abgesetztem Mittelstrahlurin. Zur Detektion von Blutbeimengungen wurden die Urinproben mittels Urispec plus (Henry Schein, Hamburg) und die Kotproben mittels Haemoculttest (Beckman Coulter GmbH, Krefeld) auf das Vorhandensein von Blutbestandteilen untersucht.

#### **1.4.6. Bearbeitung der Proben**

##### **1.4.6.1. Mikroskopischer Erregernachweis**

Zur Bestätigung der klinischen Diagnose der IAP wurde die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Akridinorange-gefärbten Blutausstrichen durchgeführt.

Ein Tropfen des frisch gewonnenen EDTA-Blutes wurde sehr dünn auf einem Objektträger ausgestrichen. Nachdem das Blut ausreichend an der Luft getrocknet war, wurden die Ausstriche 40 Sekunden in Ethanol (96 %) fixiert und erneut getrocknet (bis zu 20 Stunden). Anschließend wurden sie in der Akridinorange-Gebrauchslösung (bestehend aus 25 ml Akridinorange-Stammlösung [1,5 % 3,6-

Bis(dimethylamino)-acridin-hydrochlorid, Zink-chlorid Doppelsalz (Certistain<sup>®</sup>, Merck, Darmstadt) in 10 l Aqua dest.] und 125 ml Aqua bidest.) für 60 Minuten gefärbt. Nachdem die Ausstriche in Aqua bidest. geschwenkt und an der Luft getrocknet waren, konnten sie fluoreszenzmikroskopisch unter Ölimmersion begutachtet werden. Dafür wurde eine 600-fache Vergrößerung gewählt. Die Auswertung erfolgte gemäß Heinritzi (1990b).

#### **1.4.6.2. Hämatologische und klinisch-chemische Blutuntersuchungen**

Die Werte des Blutbildes wie Erythrozytenzahl (RBC), Hämoglobingehalt, Hämatokrit, MCV, MCH, MCHC wurden mit dem vollautomatischen Analysesystem scil Vet abc (veterinary animal blood counter) (scil animal care company, Viernheim) bestimmt. Das restliche EDTA-Blut wurde bei -70 °C aufbewahrt. Das Serum wurde durch 10-minütige Zentrifugation (Rotana 460R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen) bei 1500 x g gewonnen und anschließend in 2 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Wesseling) überführt. Die Bestimmung der Serumparmeter Eisen, Glukose, Bilirubin, Harnstoff, Kreatinin,  $\alpha$ -Amylase und Pankreaslipase erfolgte im Labor der Klinik für Wiederkäuer der Ludwig-Maximilians-Universität München photometrisch mittels eines diskreten Mehrfachanalysesystems (Hitachi 911, Roche, Mannheim). Anschließend wurde das Serum bei -20 °C aufbewahrt.

#### **1.4.6.3. Extraktion der *M. suis*-DNA**

Die Durchführung der DNA-Extraktion, der quantitativen Polymerase-Ketten-Reaktion sowie des rekombinanten HspA1-ELISA fand im Labor des Instituts für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik der Universität Hohenheim statt.

Von dem EDTA-Blut wurden 200  $\mu$ l mit 200  $\mu$ l Lysepuffer (500  $\mu$ l 1 M Tris, pH 7,4; 250  $\mu$ l  $MgCl_2$ ; 500  $\mu$ l Triton X; 16 ml 1 M Sucrose; 32,75 ml Aqua bidest.) versetzt und zentrifugiert (8000 x g, 22 °C, 60 s). Im Anschluss wurde der Überstand verworfen, der Rückstand mit 400  $\mu$ l Lysepuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis ein annähernd weißes Pellet entstand. Das Pellet wurde mit 400  $\mu$ l PBS (phosphate buffered saline)

versetzt.

Die Tupfer wurden vor der DNA-Extraktion in 1 ml PBS (Biochrom AG, Berlin) überführt.

Der Urin wurde für 10 Minuten bei 1500 x g zentrifugiert (Rotana 460R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen) und der Überstand verworfen. Der Rückstand wurde bei 2000 x g für 2 h bei 4 °C zentrifugiert um das Urinsediment zu gewinnen. Die entstandenen Pellets wurden mit 200 µl PBS resuspendiert und anschließend bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

Die DNA-Extraktion aus dem vorbereiteten EDTA-Blut, den Tupferproben, dem Urin sowie dem Urinsediment erfolgte mit dem GenElute<sup>®</sup> Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich, Steinheim) nach den Vorgaben des Herstellers. Die DNA-Extraktion aus den Kotproben wurde mit dem Stool DNA-Isolation Kit (Norgen-Biotek, Thorold, ON, Kanada) durchgeführt. Um eventuelle Kreuzkontaminationen während des Extraktionsprozesses zu überwachen, wurde eine Verfahrenskontrolle unter Verwendung von PBS mitgeführt.

#### **1.4.6.4. *M. suis*-spezifische quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion**

Die Detektion und Quantifizierung der *M. suis*-DNA erfolgte mithilfe des LightCycler<sup>®</sup> 2.0 Systems (Roche-Diagnostics, Mannheim) nach dem Protokoll von Hoelzle et al. (2007b). Die Primer und Hybridisierungssonden wurden für die Amplifikation eines 178-bp-Fragments des *M. suis*-MSG1-Gens konzipiert. Für die quantitative PCR wurde der LightCycler<sup>®</sup> Fast Start DNA Master Plus HybProbe Mix (Roche-Diagnostics, Mannheim) verwendet. In die Glaskapillaren wurden jeweils 5 µl von der extrahierten DNA und 15 µl PCR Mischung pipettiert. Die PCR-Mischung beinhaltete 4 µl Master Mix (bestehend aus Reaktionspuffer, „Hot-start“ Taq Polymerase, dNTPs und MgCl<sub>2</sub>), Primer-Sonden-Mischung (bestehend aus zwei Primern und zwei Sonden) und Aqua bidest. (PCR-grade). Es wurden bei jedem PCR-Durchlauf definierte Positivkontrollen sowie eine Negativkontrolle (Aqua bidest.) mitgeführt. Für die absolute Quantifizierung von *M. suis* im Blut der infizierten Schweine wurde eine Verdünnungsreihe der Positivkontrollen mit den Verdünnungen 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> und 10<sup>5</sup> *M. suis* Genomäquivalente/5 µl hergestellt.

#### 1.4.6.5. Nachweis der *M. suis*-spezifischen humoralen Immunantwort

Alle Seren wurden vor der Durchführung des ELISA mit *E. coli* präadsorbiert. Dazu wurden die Seren in eine 1:25-Verdünnung mit einer *E. coli*-Suspension gebracht und anschließend über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde diese Verdünnung zentrifugiert (10000 x g, 2 min) und der Überstand mit dem Verdünnungspuffer (PBS, 0,05 % Tween 20, 0,5 % Proteose-Pepton) im Verhältnis 1:100 verdünnt.

Der *M. suis*-spezifische rekombinante HspA1-ELISA wurde anhand dem von Hoelzle et al. (2007a) etablierten Protokoll durchgeführt. Zunächst wurden das rekombinante HspA1-Protein und das Kontroll-Antigen mit dem Coating-Puffer (30 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 70 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6) auf 6 µl/ml eingestellt. Die 96-Loch-Mikrotiterplatten (Microton, Greiner, Nürtingen) wurden mit 100 µl Antigen/Kavität (80 ng HspA1/Kavität) beschichtet. Eine Reihe pro Mikrotiterplatte blieb unbeschichtet, um am Ende einen Blank-Wert zu erhalten. Nach der Beschichtung wurden die Mikrotiterplatten auf einem Plattenschüttler inkubiert (1 h, 22 °C), und anschließend über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach erfolgte ein Waschdurchgang mit dem Waschpuffer (PBS, 0,05 % Tween 20). Nach jedem Waschdurchgang wurden die Platten ausgeklopft um die Restflüssigkeit zu entfernen. Um unspezifische Reaktionen zu verhindern wurden die Mikrotiterplatten zunächst mit 200 µl Blocking-Puffer inkubiert. Anschließend wurden die Platten erneut gewaschen. Die Seren wurden vor dem Auftragen auf die Platten mit dem Blocking-Puffer (PBS, 1 % Proteose-Pepton) vorverdünnt (1:100). Danach wurde jeweils 100 µl der vorverdünnten Seren in die Plattenvertiefungen gebracht. Nach einer Inkubationszeit von 1 h auf dem Schüttler und einem weiteren Waschdurchgang wurden 100 µl des HRP-konjugierten sekundären Antikörpers (Horseradish-Peroxidase-konjugiertes anti-Schwein-Konjugat, Sigma-Aldrich, Steinheim) aufgetragen. Im letzten Schritt wurde 100 µl/Kavität ABTS-Gebrauchslösung (2,2-Azino-di[3-ethyl-Benzthiazolinsulfat]; Roche-Diagnostics, Mannheim) auf die Mikrotiterplatten pipettiert. Nach 30 min Inkubationszeit erfolgte die Auswertung mithilfe des TECAN Plate Readers (TECAN, Männedorf, Schweiz) bei einer Wellenlänge von 405 nm.

#### **1.4.7. Statistische Auswertung**

Die Daten wurden mit den Programmen Excel (Microsoft Office) und IBM SPSS Statistics 20 ausgewertet. Für die Analyse der hämatologischen und klinisch-chemischen Parameter wurde eine deskriptive Statistik durchgeführt, die den Mittelwert, die Standardabweichung (SD) und den Standardfehler des Mittelwerts (SEM) umfasste. Der Vergleich der Parameter beider Versuchsgruppen miteinander erfolgte mittels einseitigen Mann-Whitney-*U*-Test. Entsprechend der exakten Signifikanz nach Fischer galten Unterschiede mit Werten von  $P < 0,05$  als signifikant. Mit dem Spearman-Rank-Korrelationstest wurde die Korrelation zwischen dem Logarithmus der Erregermenge im Blut und den Blutparameters untersucht.



## **IV. ERGEBNISSE**

### **1. Ergebnisse des Vorversuchs**

Alle drei Tiere des Vorversuchs entwickelten acht Tage nach der experimentellen Infektion mit *M. suis* ausgeprägte Anzeichen einer akuten IAP. Es waren Fieber (40,5 - 41,0 °C), Apathie und Anorexie zu beobachten. Alle drei Tiere erreichten vier Punkte im „Score-System“. Die klinische Diagnose wurde anschließend mithilfe des Akridinorange-gefärbten Blutaussstrichs bestätigt. In den Ausstrichen waren zahlreiche Mykoplasmen an der Erythrozytenoberfläche und frei im Plasma zu erkennen. Die Untersuchung mit der LC-PCR (LightCycler®-PCR) ergab eine Erregermenge im Blut von  $10^8$  *M. suis*/ml Blut bei einem Versuchstier und eine Erregermenge im Blut von  $10^9$  *M. suis*/ml Blut bei den anderen beiden Versuchstieren. Die Blutuntersuchung ergab eine Anämie (Hkt < 18 %) und eine Hypoglykämie (Glukose < 1 mmol/l) der Tiere. Nach der Entnahme des Bluts für Infektion der Tiere des Hauptversuches, wurden die Tiere des Vorversuches euthanasiert.

### **2. Ergebnisse des Hauptversuchs**

#### **2.1. Klinische Untersuchung**

Alle Tiere beider Versuchsgruppen waren im Zeitraum von der Einnistung bis zur Infektion klinisch unauffällig und zeigten keine Symptome die einer Infektion mit *M. suis* entsprechen (0 Score-Punkte).

##### **2.1.1. Klinische Untersuchung bei den splenektomierten Tieren**

Fünf Tage nach der experimentellen Infektion konnte bei allen Tieren der Gruppe A (splenektomiert) Blässe beobachtet werden. Sechs Tage nach der Infektion entwickelten drei Tiere einen klinischen Score von fünf Punkten mit Fieber bis zu 41,9 °C, Ohrsrandzyanosen, reduzierter Futteraufnahme sowie Apathie. Ein weiteres Tier dieser Gruppe erreichte sieben Tage p.i. fünf Score-Punkte. Die restlichen drei Tiere der Gruppe A zeigten am Tag acht p.i. hochgradige Symptome einer Hypoglykämie bis hin zum Festliegen sowie einer inneren

Körpertemperatur von 41,5 - 41,7 °C. Aufgrund der vor dem Versuch festgelegten Abbruchkriterien wurden alle Tiere der Gruppe A zwischen den Versuchstagen sechs bis acht euthanasiert.

### **2.1.2. Klinische Untersuchung bei den nicht splenektomierten Tieren**

Bei den Tieren der Gruppe B (nicht splenektomiert) konnte bis zum fünften Tag p.i. keine klinische Symptomatik beobachtet werden. Am sechsten Tag entwickelten sie Anzeichen einer Anämie, die als geringgradige Blässe in Erscheinung trat. Die innere Körpertemperatur erreichte ein Maximum von 40,0 - 40,6 °C an den Versuchstagen neun und zehn. Keines der sieben Tiere der Gruppe B erreichte drei Score-Punkte innerhalb des Versuchszeitraums. Am Tag 17 p.i. waren bei einem Tier Hautveränderungen am ventralen Abdomen zu beobachten. Die kutanen Veränderungen traten als scharf abgegrenzte, teils fluktuierende Rötungen in Erscheinung, die sich größtenteils nicht von der Haut absetzten (Petechien) und zum Teil erhaben waren (Urtikaria). Bei weiteren fünf Tieren der Versuchsgruppe B waren bis zum Tag 21 p.i. lokale Petechien zu erkennen (Abb. 5b). Bei drei Tieren konnten generalisierte Hautveränderungen mit Petechien und Urtikaria beobachtet werden (Abb. 5a). Nach zehn Tagen trat bereits eine klinische Besserung der Hautreaktionen ein. Nach 20 Tagen (37 - 44 Tage p.i.) kam es zum vollständigen Rückgang der Symptome ohne dass eine Therapie eingeleitet wurde.



**Abbildung: 5 a**



**Abbildung: 5 b (a) Generalisierte und (b) lokale Hautveränderungen eines Tieres der Gruppe B (nicht splenektomiert).**

## 2.2. Mikroskopischer Erregernachweis

Bei drei von sieben Tieren der Gruppe A (splenektomiert) konnte ab dem Tag vier p.i. *M. suis* im Akridinorange-gefärbten Blutaussstrich detektiert werden. Am Tag sechs p.i. waren alle splenektomierten Tiere im Akridinorange-gefärbten Blutaussstrich *M. suis*-positiv. Demnach konnten die Mykoplasmen ab einer mithilfe der LC-PCR ermittelten Erregermenge von  $10^7$  *M. suis*/ml Blut mikroskopisch nachgewiesen werden.

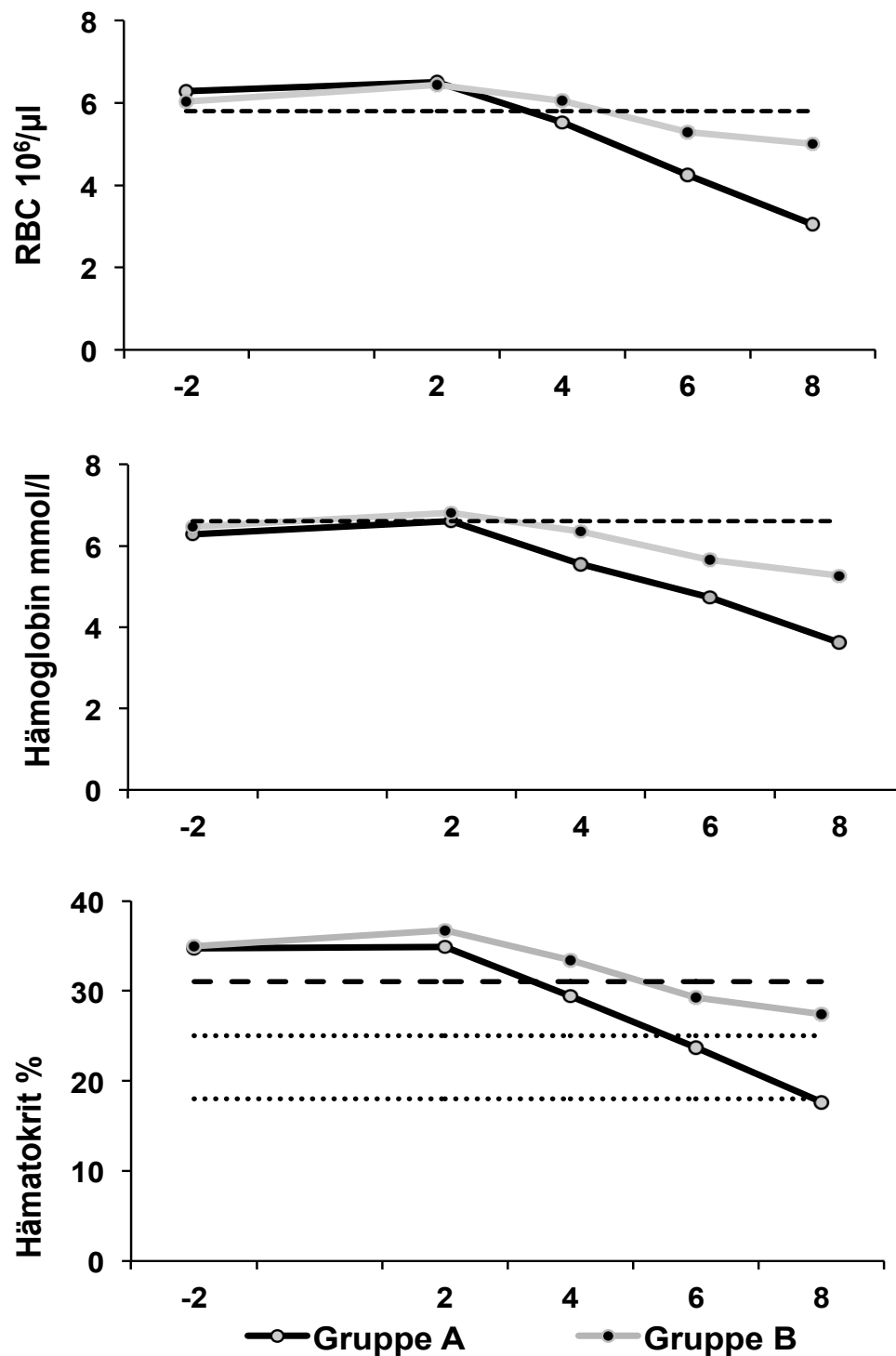
Bei den Tieren der Gruppe B (nicht splenektomiert) konnte zu keinem Zeitpunkt des Versuchs *M. suis* im Blutaussstrich detektiert werden.

## 2.3. Hämatologische Parameter

In Abbildung 6 sind die hämatologischen Parameter der splenektomierten sowie der nicht splenektomierten Tiere während der ersten acht Versuchstage gruppenvergleichend dargestellt. Bei den Tieren der Gruppe A (splenektomiert) waren vier Tage p.i. Anzeichen einer Anämie feststellbar ( $\text{RBC} < 5,8 \times 10^6/\mu\text{l}$ ; Hämatokrit  $< 32$  %; Hämoglobin  $< 6,6$  mmol/l). Bei den Tieren der Gruppe B (nicht splenektomiert) wurde anhand der Blutparameter nach sechs Tagen p.i. eine milde Anämie nachgewiesen. In der Gruppe A entwickelten die Versuchstiere bis zum Tag acht p.i. eine hochgradige Anämie mit RBC-Werten von  $3,04 \times 10^6/\mu\text{l}$  ( $\text{SD} \pm 0,68$ ;  $\text{SEM} \pm 0,39$ ), einem Hämatokrit von 17 % ( $\text{SD} \pm 3,79$ ;  $\text{SEM} \pm 2,19$ ), und einer Hämoglobinkonzentration von 3,62 mmol/l ( $\text{SD} \pm 0,69$ ;  $\text{SEM} \pm 0,39$ ). Wie in Tabelle 3 und in Abbildung 7 dargestellt, bestand bei den splenektomierten Tieren eine Korrelation zwischen den Werten der Parameter RBC, Hämatokrit, Hämoglobinkonzentration und der Erregermenge im Blut ( $P < 0,01$ ).

Im Vergleich zu den nicht splenektomierten Tieren zeigten die splenektomierten Tiere vom Tag vier bis zum Tag acht p.i. signifikant niedrigere RBC- und Hämatokrit-Werte sowie Hämoglobinkonzentrationen ( $P < 0,05$ ). Die Tiere der Gruppe B (nicht splenektomiert) erreichten am Tag acht nach der Infektion Werte einer mittelgradigen Anämie mit einer RBC-Konzentration von  $5,00 \times 10^6/\mu\text{l}$  ( $\text{SD} \pm 0,68$ ;  $\text{SEM} \pm 0,26$ ), einem Hämatokrit von 27 % ( $\text{SD} \pm 3,26$ ;  $\text{SEM} \pm 1,23$ ), und einer Hämoglobinkonzentration von 5,26 mmol/l ( $\text{SD} \pm 0,58$ ;  $\text{SEM} \pm 0,22$ ). Nach dem Tag 14 p.i. bis zum Ende des Versuchs erreichten die hämatologischen Werte bei den nicht splenektomierten Tieren wieder den Referenzbereich

(Kixmüller et al. 2006). Es bestand bei den splenektomierten Tieren eine signifikante Korrelation zwischen dem Hämatokrit und der Erregermenge im Blut ( $P < 0,01$ ). Die MCV-, MCH- und MCHC-Konzentrationen lagen in beiden Gruppen während des gesamten Versuchszeitraumes innerhalb des Referenzbereiches.



**Abbildung 6:** Vergleich der Mittelwerte der hämatologischen Blutparameter der Tiere der Gruppe A (splenektomiert) und der Gruppe B (nicht splenektomiert) innerhalb der ersten acht Tage p.i. (x-Achse). Die gestrichelten Linien stellen den Referenzbereich dar. Die gepunkteten Linien markieren den Übergang zu einer mittel- bzw. hochgradigen Anämie. SD und SEM sind im Text angegeben.

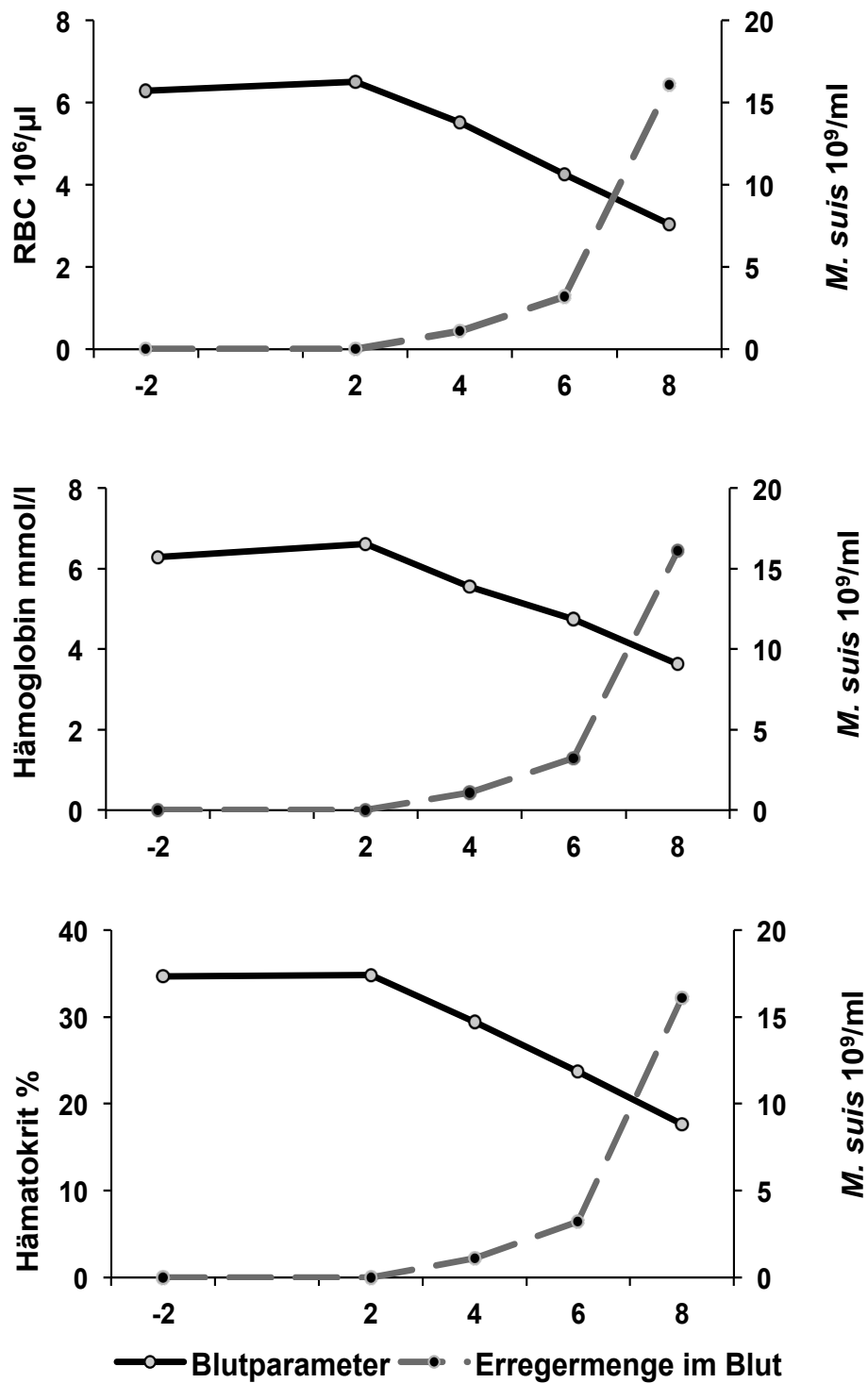


Abbildung 7: Korrelation der mittleren Erregermenge im Blut mit dem Mittelwert der hämatologischen Parameter bei den Tieren der Gruppe A (splenektomiert) innerhalb der ersten acht Tage p.i. (x-Achse) ( $P < 0,05$ ). SD und SEM sind im Text angegeben.

#### 2.4. Klinisch-chemische Parameter

Bei den Tieren der Gruppe A (splenektomiert) wurden ab dem sechsten Tag p.i. reduzierte Blutglukosewerte in negativer Korrelation zu der Erregermenge im Blut festgestellt. Bis zum achten Versuchstag entwickelten die Tiere eine ausgeprägte Hypoglykämie. Wie in Abbildung 8 dargestellt wiesen die Tiere zwischen dem sechsten und dem achten Tag p.i. signifikant niedrigere Blutglukosewerte ( $< 1 \text{ mmol/l}$ ;  $\text{SD} \pm 0,42$ ) auf als die Tiere der Gruppe B ( $P < 0,05$ ). Die Glukosewerte der Tiere der Gruppe B (nicht splenektomiert) verliefen über den gesamten Versuchszeitraum innerhalb des Referenzbereiches. Weiterhin wurden bei den Tieren der Gruppe A an Tag acht bzw. Tag zwei p.i. erhöhte Harnstoff- und Bilirubinkonzentrationen im Serum festgestellt. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen traten bei den Parametern Eisen, Kreatinin, Pankreasamylase und Pankreaslipase auf. Dennoch konnte bei den Tieren der Gruppe A (splenektomiert) bis zum sechsten Tag p.i. ein Anstieg des Serumeisens innerhalb des Referenzbereiches festgestellt werden. Die durchschnittliche Eisenkonzentration im Serum der splenektomierten Tiere erreichte an Tag sechs p.i. ein Maximum von  $25,38 \text{ } \mu\text{mol/ml}$  (Abb. 10). Wie in Tabelle 3 und Abbildung 9 dargestellt, konnten bei den splenektomierten Tieren signifikante Korrelationen ( $P < 0,01$ ) zwischen der Erregermenge im Blut und der Blutglukose respektive den Harnstoffwerten festgestellt werden. Bei den nicht splenektomierten Tieren traten signifikante Korrelationen zwischen der Erregermenge im Blut und dem Bilirubin auf ( $P < 0,01$ ). Zwischen den anderen untersuchten Blutparameter und der Erregermenge im Blut konnte weder bei den splenektomierten noch bei den nicht splenektomierten Tieren signifikante Korrelationen festgestellt werden.



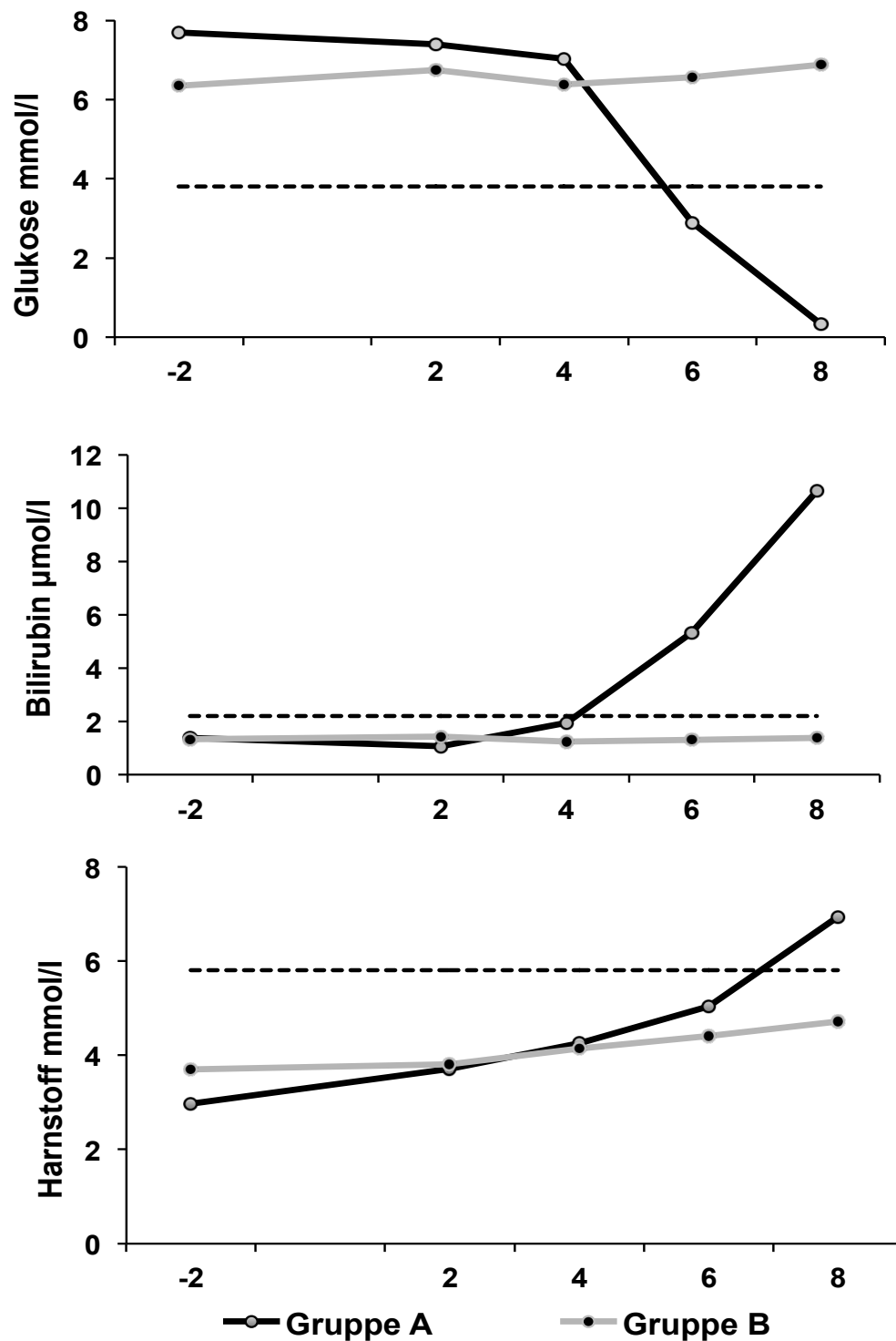


Abbildung 8: Vergleich der Mittelwerte der klinisch-chemischen Blutparameter der Tiere der Gruppe A (splenektomiert) und der Gruppe B (nicht splenektomiert) innerhalb der ersten acht Tage p.i. (x-Achse). Die gestrichelten Linien stellen den Referenzbereich dar.

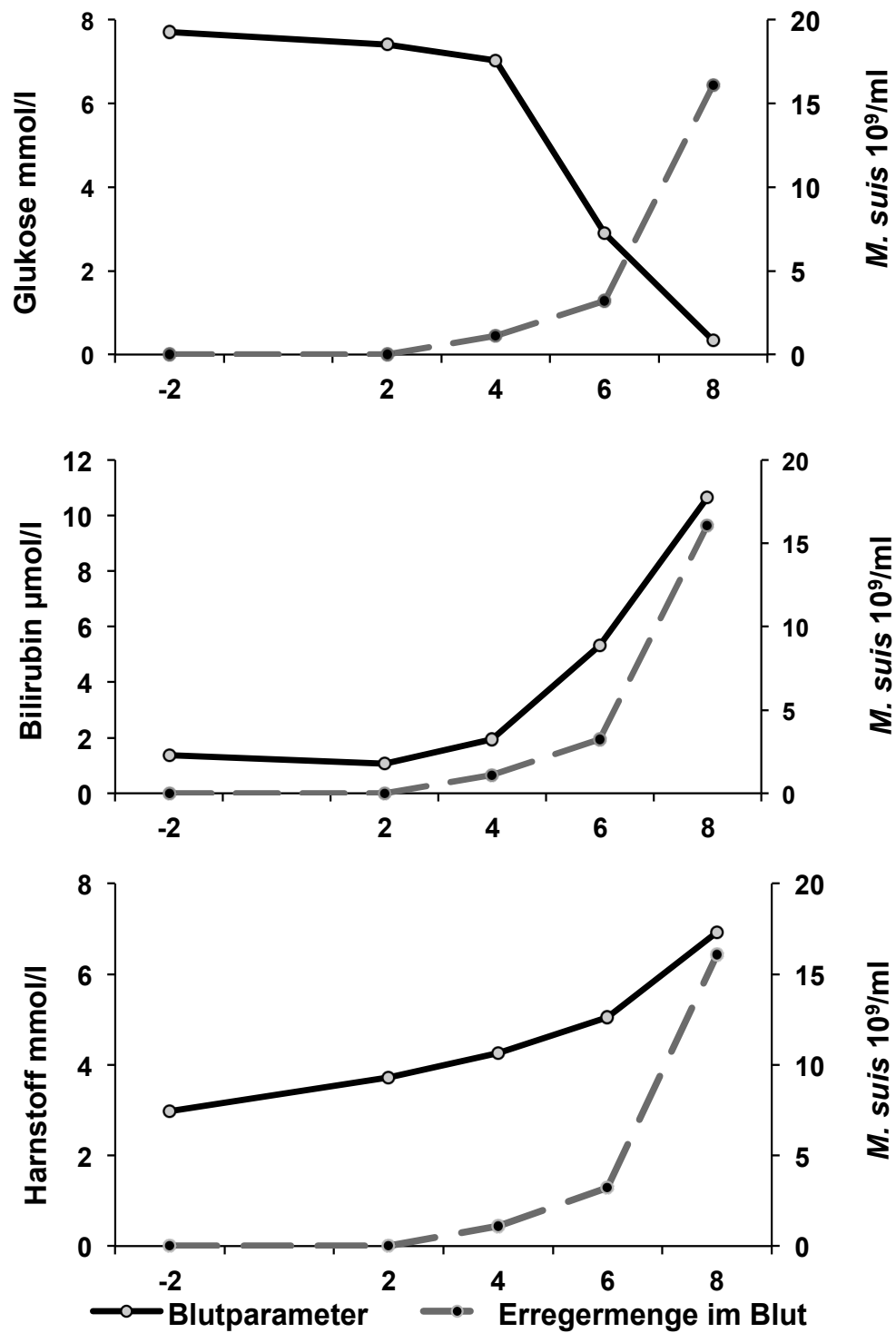
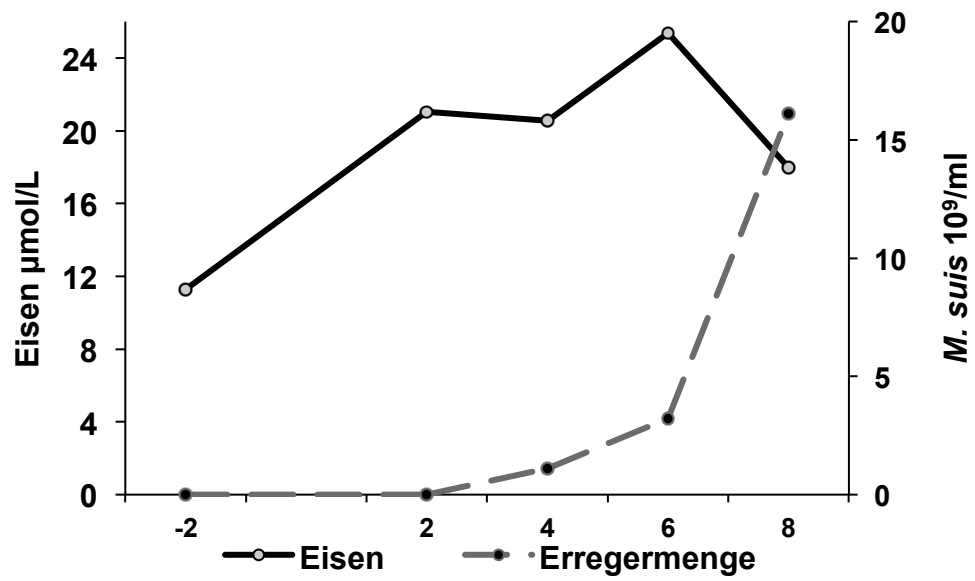


Abbildung 9: Korrelation der mittleren Erregermenge im Blut mit dem Mittelwert der klinisch-chemischen Parameter bei den Tieren der Gruppe A (splenektomiert) innerhalb der ersten acht Tage p.i. (x-Achse) ( $P < 0,05$ ).



**Abbildung 10:** Darstellung der mittleren Serumeisenkonzentration von den Tieren der Gruppe A (splenektomiert) innerhalb der ersten 8 Versuchstage (x-Achse). Die y-Achse stellt die durchschnittliche Erregermenge im Blut dar.

**Tabelle 3: Korrelation zwischen der Erregermenge im Blut und den Blutparametern**

<i>Blutparameter</i>	<i>Statistische Analyse</i>	<i>Gruppe A</i>	<i>Gruppe B</i>
RBC	Korrelationskoeffizient <sub>a</sub>	-,771**	-,014
	Signifikanz	,000	,886
	<i>n</i>	31	112
Hämoglobin	Korrelationskoeffizient <sub>a</sub>	-,748**	-,155
	Signifikanz	,000	,103
	<i>n</i>	31	112
Hämatokrit	Korrelationskoeffizient <sub>a</sub>	-,411*	-,253**
	Signifikanz	,021	,007
	<i>n</i>	31	112
Glukose	Korrelationskoeffizient <sub>a</sub>	-,666**	,075
	Signifikanz	,000	,430
	<i>n</i>	31	112
Harnstoff	Korrelationskoeffizient <sub>a</sub>	,714**	-,086
	Signifikanz	,000	,367
	<i>n</i>	31	112
Bilirubin	Korrelationskoeffizient <sub>a</sub>	,635**	-,247**
	Signifikanz	,000	,009
	<i>n</i>	31	112

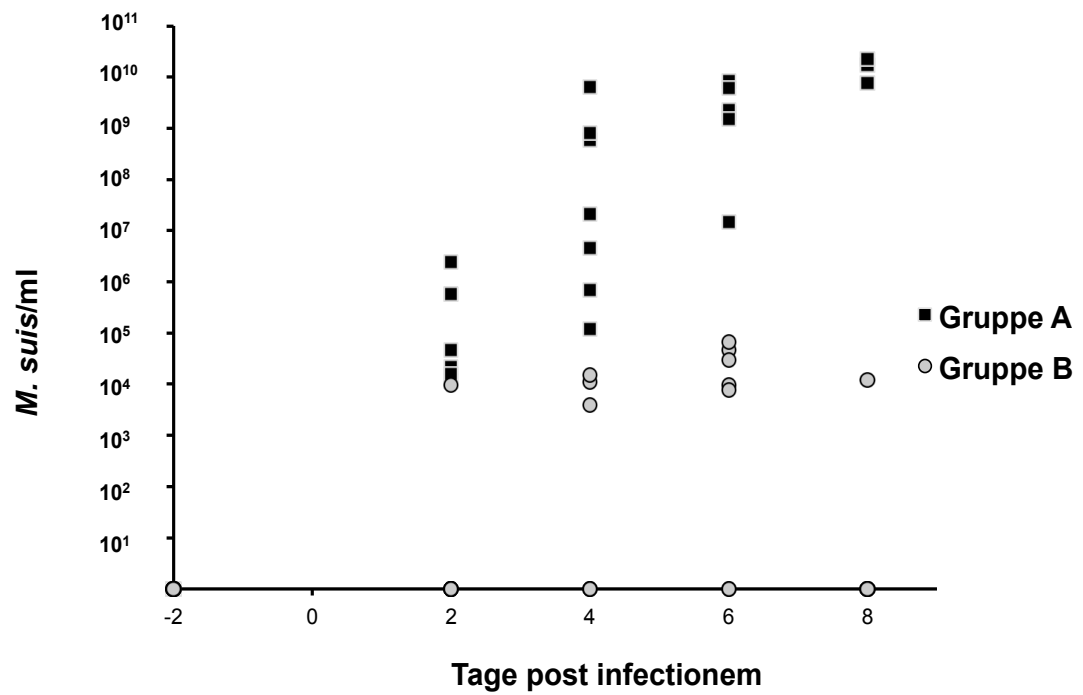
a) *Spearman-Rho*, \* Signifikanzwert  $P < 0,05$ , \*\* Signifikanzwert  $P < 0,01$

## 2.5. Erregermenge im Blut

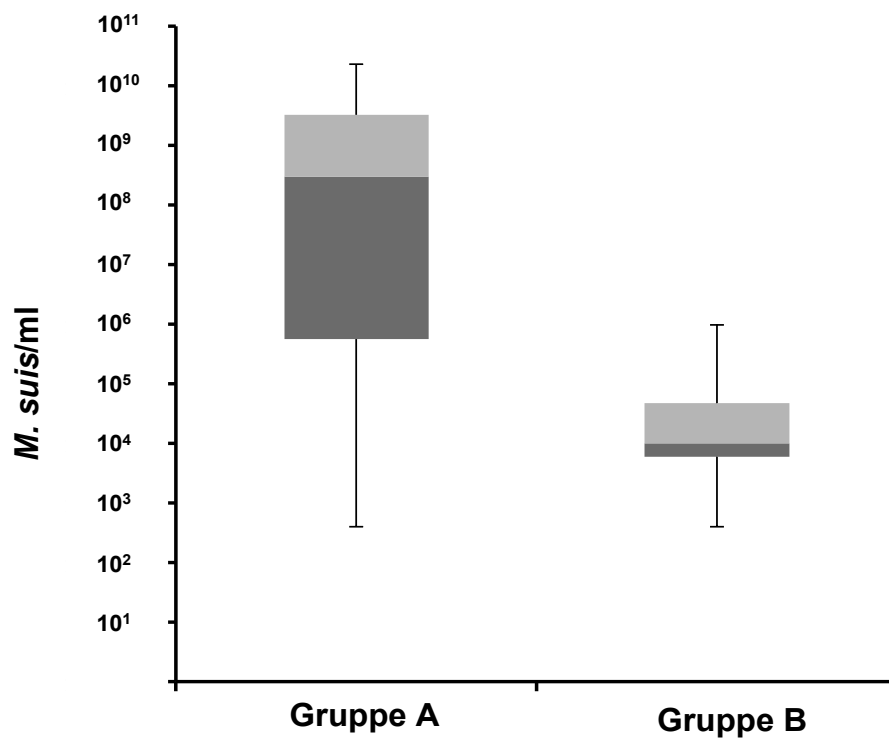
Zu Beginn des Versuchs wiesen alle Tiere der Gruppen A und B ein *M. suis*-negatives Ergebnis in der PCR auf. Bei allen Tieren der Gruppe A (splenektomiert) war zwei Tage p.i. *M. suis*-DNA im Blut nachweisbar. Im Gegensatz dazu konnte in der Gruppe B (nicht splenektomiert) 14 Tage p.i. bei allen Tieren *M. suis*-DNA nachgewiesen werden. Wie in Tabelle 4 dargestellt, konnte bei allen Tieren der Gruppe B an den Tagen 35, 42, 49, 63 und 77 p.i. ein *M. suis*-positives Ergebnis in der PCR festgestellt werden. An den anderen Versuchstagen variierte die Anzahl der positiven Tiere zwischen drei und sechs Tieren.

Die Tiere der Gruppe A erreichten eine mittlere Erregermenge von  $5,36 \times 10^5$  *M. suis*/ml Blut am Tag zwei p.i., eine mittlere Erregermenge von  $1,11 \times 10^9$  *M. suis*/ml Blut am Tag vier p.i., eine mittlere Erregermenge von  $3,22 \times 10^9$  *M. suis*/ml Blut am Tag sechs p.i., und eine mittlere Erregermenge von  $1,61 \times 10^{10}$  *M. suis*/ml Blut am Tag acht p.i..

Die Tiere der Gruppe B erreichten eine mittlere Erregermenge von  $1,35 \times 10^3$  *M. suis*/ml Blut am Tag zwei p.i., eine mittlere Erregermenge von  $4,27 \times 10^3$  *M. suis*/ml Blut am Tag vier p.i., eine mittlere Erregermenge von  $2,25 \times 10^4$  *M. suis*/ml Blut am Tag sechs p.i., und eine mittlere Erregermenge von  $1,64 \times 10^5$  *M. suis*/ml Blut am Tag acht p.i. Ab dem Tag 63 p.i. fielen die Werte der mittleren Erregermenge von den nicht splenektomierten Tieren ab bis zu  $6,85 \times 10^3$  *M. suis*/ml Blut am Tag 83 p.i.. In Abbildung 11 sind die Erregermengen im Blut von den Einzeltieren beider Versuchsgruppen bis zum Tag acht p.i. dargestellt. Die Erregermenge im Blut war bei den splenektomierten Tieren signifikant höher als bei den nicht splenektomierten Tieren (Abb. 12).



**Abbildung 11: Vergleich der Erregermenge im Blut bei den Tieren der Gruppe A (splenektomiert) und den Tieren der Gruppe B (nicht splenektomiert) innerhalb der ersten acht Tage p.i.. Die Erregermenge ist als logarithmische DNA-Kopienanzahl dargestellt.**



**Abbildung 12:** Vergleich der Mittelwerte der Erregermenge im Blut der *M. suis*-positiven Versuchstiere der Gruppe A (splenektomiert) und der Gruppe B (nicht splenektomiert) ( $P < 0,05$ ). Die Darstellung ist logarithmisch skaliert.

**Tabelle 4: Mittlere Erregermenge im Blut während des Infektionsverlaufes, bestimmt mittels LC-PCR**

Tage p.i.	Gruppe A (splenektomiert, n=7)			Gruppe B (nicht splenektomiert, n=7)		
	<i>M. suis</i> /ml Blut (Mittelwert)	SD*	SEM**	<i>M. suis</i> /ml Blut (Mittelwert)	SD*	SEM**
	(PCR-positive Tiere/Gruppengröße)			(PCR-positive Tiere/Gruppengröße)		
2	5.36 x 10 <sup>5</sup> (7/7)	9.05 x 10 <sup>5</sup>	3.42 x 10 <sup>5</sup>	1.35 x 10 <sup>3</sup> (1/7)	3.57 x 10 <sup>3</sup>	1.35 x 10 <sup>3</sup>
4	1.11 x 10 <sup>9</sup> (7/7)	2.34 x 10 <sup>9</sup>	8.86 x 10 <sup>8</sup>	4.27 x 10 <sup>3</sup> (3/7)	6.19 x 10 <sup>3</sup>	2.34 x 10 <sup>3</sup>
6	3.22 x 10 <sup>9</sup> (7/7)	2.99 x 10 <sup>9</sup>	1.13 x 10 <sup>9</sup>	2.25 x 10 <sup>4</sup> (5/7)	2.51 x 10 <sup>4</sup>	9.49 x 10 <sup>3</sup>
8	1.61 x 10 <sup>10</sup> (3/3)	7.62 x 10 <sup>9</sup>	4.40 x 10 <sup>9</sup>	1.64 x 10 <sup>5</sup> (3/7)	3.58 x 10 <sup>5</sup>	1.35 x 10 <sup>5</sup>
14				9.93 x 10 <sup>4</sup> (5/7)	1.56 x 10 <sup>5</sup>	5.89 x 10 <sup>4</sup>
21				1.83 x 10 <sup>5</sup> (5/7)	2.27 x 10 <sup>5</sup>	8.59 x 10 <sup>4</sup>
28				1.87 x 10 <sup>5</sup> (5/7)	3.89 x 10 <sup>4</sup>	1.47 x 10 <sup>5</sup>
35				5.31 x 10 <sup>4</sup> (7/7)	3.79 x 10 <sup>4</sup>	1.43 x 10 <sup>4</sup>
42				6.33 x 10 <sup>4</sup> (7/7)	7.96 x 10 <sup>4</sup>	3.01 x 10 <sup>4</sup>
49				6.16 x 10 <sup>4</sup> (7/7)	5.33 x 10 <sup>4</sup>	2.01 x 10 <sup>4</sup>
56				3.18 x 10 <sup>4</sup> (6/7)	7.11 x 10 <sup>4</sup>	2.69 x 10 <sup>4</sup>
63				1.31 x 10 <sup>4</sup> (7/7)	1.32 x 10 <sup>4</sup>	5.01 x 10 <sup>3</sup>
70				6.35 x 10 <sup>3</sup> (6/7)	4.94 x 10 <sup>3</sup>	1.87 x 10 <sup>3</sup>
77				8.66 x 10 <sup>3</sup> (7/7)	7.30 x 10 <sup>3</sup>	2.76 x 10 <sup>3</sup>
83				6.85 x 10 <sup>3</sup> (5/7)	6.85 x 10 <sup>3</sup>	2.59 x 10 <sup>3</sup>

\* Standardabweichung \*\* Standardfehler des Mittelwerts



## 2.6. Erregermenge in den Tupfer-, Urin- und Kotproben

Im Zeitraum von acht Versuchstagen wurden in der Gruppe A (splenektomiert) insgesamt 93 Tupferproben (jeweils 31 Nasen-, Speichel- und Vaginaltupfer) entnommen. Am achten Tag p.i. erfolgte die Tupferentnahme nur bei drei Tieren der Gruppe A, da vier Tiere zu diesem Zeitpunkt bereits euthanasiert waren. Von den 93 Tupferproben wurde in 19 Tupfern *M. suis*-DNA detektiert.

Wie in Tabelle 5 dargestellt, waren bis zum Tag vier p.i. alle Tupfer der Gruppe A in der PCR *M. suis*-negativ. Von den 30 Tupfern, die im Zeitraum von sechs bis acht Tagen p.i. entnommen wurden, konnte in sieben von 10 Nasentupfern, sechs von 10 Speicheltupfern und sechs von 10 Vaginaltupfern *M. suis*-DNA nachgewiesen werden. Die Erregermenge pro Tupfer bewegte sich zwischen  $9,8 \times 10^6$  und  $8,0 \times 10^7$  *M. suis*/Tupfer.

In den ersten acht Versuchstagen wurden insgesamt 18 Urinproben von den sieben Tieren der Gruppe A (splenektomiert) ausgewertet. Die Urinproben waren bis zum vierten Tag nach der Infektion in der PCR *M. suis*-negativ. Ab dem sechsten Versuchstag konnte in 11 der insgesamt 18 Proben *M. suis*-DNA nachgewiesen werden. Die Erregermenge der *M. suis*-positiven Urinproben betrug von  $5,8 \times 10^5$  bis  $4,7 \times 10^2$  *M. suis*/ml Urin. Die Urinproben wurden vor dem Erregernachweis auf das Vorhandensein von Blutbestandteilen untersucht.

In acht Proben wurden Erythrozytenbestandteile und *M. suis*-DNA nachgewiesen. Vier Proben enthielten keine Erythrozytenbestandteile und waren in der PCR *M. suis*-positiv. Zwei Proben enthielten weder Erythrozytenbestandteile, noch *M. suis*-DNA. Vier der 18 Urinproben enthielten zwar Erythrozytenbestandteile, aber es war keine *M. suis*-DNA nachweisbar.

In 10 von 18 Urinsedimenten der Gruppe A-Tiere (splenektomiert) konnte ebenfalls ab dem Tag fünf p.i. *M. suis*-DNA detektiert werden. Es wurde eine Erregermenge von  $7,4 \times 10^4$  bis  $2,5 \times 10^2$  *M. suis*/Urinsediment nachgewiesen.

In keiner der 31 untersuchten Kotproben aus Schweinen der Gruppe A (splenektomiert) konnte *M. suis*-DNA nachgewiesen werden.

**Tabelle 5: Ergebnisse der LC-PCR**

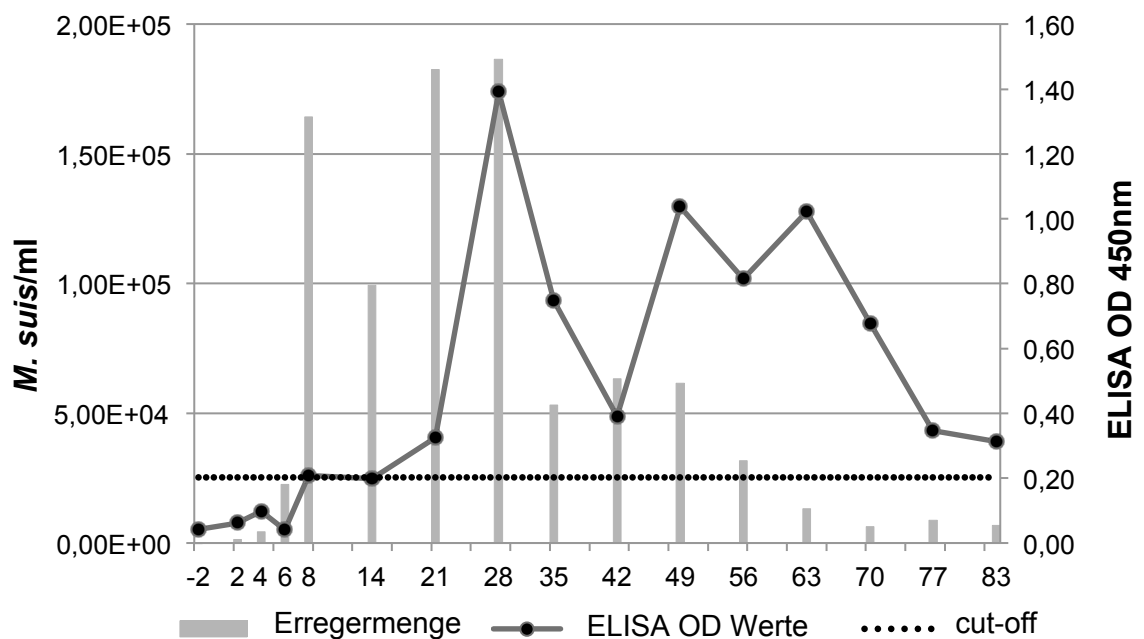
		<i>Tag -2</i>	<i>Tag 2</i>	<i>Tag 4</i>	<i>Tag 6</i>	<i>Tag 8</i>
		<i>pos./neg.</i>	<i>pos./neg.</i>	<i>pos./neg.</i>	<i>pos./neg.</i>	<i>pos./neg.</i>
Gruppe A (splenektomiert)	Nasentupfer	0/7	0/7	0/7	4/7	3/3
	Speicheltupfer	0/7	0/7	0/7	4/7	2/3
	Vaginaltupfer	0/7	0/7	0/7	3/7	3/3
Gruppe B (nicht splenektomiert)	Nasentupfer	0/7	0/7	0/7	1/7	1/7
	Speicheltupfer	0/7	0/7	0/7	1/7	0/7
	Vaginaltupfer	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7

Bei den Tieren der Gruppe B (nicht splenektomiert) wurden insgesamt im Zeitraum der ersten acht Versuchstage 105 Tupferproben entnommen. Davon jeweils 35 Nasen-, Speichel- und Vaginaltupfer. In drei der Tupfer konnte am Tag sechs p.i. *M. suis*-DNA nachgewiesen werden. Bei zwei von drei positiven Tupferproben handelte es sich um Speicheltupfer und bei einer um einen Nasentupfer.

Weder im Urin noch im Kot der nicht splenektomierten Tiere konnte innerhalb der ersten acht Versuchstage *M. suis*-DNA detektiert werden.

### 3. Humorale Immunantwort

Zu Beginn des Versuchs konnten bei keinem der Tiere der Gruppe A und B *M. suis*-spezifische Antikörper im HspA1-ELISA detektiert werden. Bei den Tieren der Gruppe A (splenektomiert) waren über den gesamten Versuchszeitraum bis zur Euthanasie (sechs bis acht Tage p.i.) keine anti-*M. suis*-Antikörper nachweisbar. Im Unterschied dazu zeigten alle Tiere der Gruppe B (nicht splenektomiert) eine Serokonversion. Bei vier Tieren konnten zwischen den Tagen acht und 14 p.i. *M. suis*-spezifische Antikörper im HspA1-ELISA nachgewiesen werden. (sechs bis zehn Tage nachdem die Tiere in der PCR *M. suis*-positiv waren). Bei den restlichen Versuchstieren wurden bis zum Tag 35 p.i. (12 - 31 Tage nachdem sie ein *M. suis* positives Ergebnis in der PCR aufwiesen) rHspA1-reaktive Antikörper detektiert. Sechs von sieben Tieren erreichten ein Maximum der humoralen Immunantwort zwischen den Tagen 28 - 35 p.i. Zu diesem Zeitpunkt waren die Hautveränderungen der Tiere am stärksten ausgeprägt und die Erregermenge im Blut bei allen Tieren gleichbleibend hoch. Die rHspA1-reaktiven Antikörper waren bei den nicht splenektomierten Tieren bis zum Ende des Versuchs nachweisbar (Abb.13).



**Abbildung 13:** Darstellung der mittleren Erregermenge im Blut der Tiere der Gruppe B und der mittleren ELISA OD-Werten innerhalb des gesamten Versuchszeitraums (x-Achse).

## V. DISKUSSION

Das hämotrophe Bakterium *M. suis* ist das ätiologische Agens der infektiösen Anämie des Schweins (IAP), der am häufigsten beim Schwein vorkommenden Anämie (Hoelzle et al., 2011). Der Infektionsverlauf ist sowohl von endo- und exogenen Stressfaktoren als auch von der Infektionsdosis und der Erregervirulenz abhängig (Hoelzle, 2008). Die akute Verlaufsform findet man vor allem bei immunsupprimierten Tieren nach Belastungssituationen (z.B. Geburt, Absetzen, Umstallung) (Hoelzle, 2008). Sie ist durch eine hochgradige Anämie, Fieber und eine massive Hypoglykämie gekennzeichnet (Hoelzle, 2008). Weitaus häufiger treten jedoch chronische Infektionen auf, die oft mit anderen Infektionskrankheiten vergesellschaftet sind (Hoelzle, 2008). Diese Form der IAP tritt entweder klinisch inapparent in Erscheinung oder geht mit einer gering- bis mittelgradigen Anämie, einem Rückgang der Mast- und Reproduktionsleistung, Ohrtrandnekrosen sowie Hautveränderungen einher. Demzufolge sind der Immunstatus der betroffenen Tiere und die Virulenz des Erregers entscheidende Faktoren, welche die klinische Ausprägung der IAP beeinflussen (Hoelzle, 2008). Vorrangegangene Studien zeigten, dass es offensichtlich *M. suis*-Isolate gibt, die signifikant virulenter sind, als bislang beschrieben. Die hoch-virulenten *M. suis*-Isolate KI3806 und 08/07 wurden inzwischen relativ gut charakterisiert und KI3806 zudem vollständig sequenziert (Groebel et al., 2009; Hoelzle et al., 2009; Oehlerking et al., 2011). Diese Isolate sind in der Lage, in Zellen einzudringen und den programmierten Zelltod bei Erythrozyten hervorzurufen (Felder et al., 2011). Eine Therapie mit Tetrazyklinen von Tieren, die mit hochvirulenten Stämmen infiziert sind führt meist zu keiner Verbesserung der klinischen Symptomatik (Groebel et al., 2009). Zudem wurde die Besiedlung und Zerstörung von Endothelzellen durch KI3806 nachgewiesen (Sokoli et al., 2013).

In der vorliegenden Studie wurden erstmalig die klinischen und labordiagnostischen Auswirkungen des *M. suis*-Isolats KI3806 bei splenektomierten und nicht splenektomierten Schweinen untersucht und der Krankheitsverlauf der beiden Versuchsgruppen miteinander verglichen. Die Gruppe der nicht splenektomierten Tiere sollte zum einen als Vergleichsgruppe herangezogen werden und zum anderen den Bezug zur Praxis herstellen.

## 1. Klinischer Verlauf

In der vorliegenden Studie war insbesondere die kurze Inkubationszeit von nur fünf Tagen auffällig, nach dieser kurzen Zeitspanne waren bei allen infizierten, splenektomierten Tieren hochgradige Symptome einer akuten IAP mit Fieber, Anämie und lebensbedrohlicher Hypoglykämie vorhanden. Eine ähnlich kurze Inkubationszeit wurde nach experimenteller Infektion mit dem ebenfalls invasiven *M. suis*-Isolat 08/07 von Groebel et al. (2009) berichtet. Im Gegensatz dazu betrug die Inkubationszeit in früheren Studien von Heinritzi (1990b), nach experimenteller Infektion splenektomierter Tieren dieser Altersgruppe mit nicht-invasiven Isolaten, durchschnittlich sieben Tage. Neben der höheren Virulenz des verwendeten Isolats KI3806 könnte die applizierte Erregermenge ein entscheidendes Kriterium für die kurze Inkubationszeit sein, da bei den Tieren des Vorversuchs, die erst acht Tage nach der Infektion eine akute IAP entwickelten, eine geringere Erregermenge inokuliert wurde.

Bei den nicht splenektomierten Tieren konnten ebenfalls charakteristische Symptome einer IAP beobachtet werden, die aber im Vergleich zu den splenektomierten Tieren, eine deutlich milderen Ausprägung aufwiesen. Nach 17 Tagen p.i. zeichneten sich signifikante Hautveränderungen mit Urtikaria und hämorrhagischer Diathese bei den nicht splenektomierten Tieren ab. Hautveränderungen von dieser Art sind im Zusammenhang mit *M. suis* als Morbus maculosus beschrieben (Heinritzi, 1990b). Der Begriff Morbus maculosus wird in der Literatur zur Beschreibung für Hauteinblutungen mit unterschiedlichen Pathogenesen herangezogen. In der Humanmedizin wird die Autoimmunkrankheit Morbus maculosus Werlhof beschrieben, die durch Petechien und Ekchymosen aufgrund einer Thrombopenie in Erscheinung tritt (Scaradavou et al., 1997). Bei einem gutartigen Verlauf verschwinden hierbei die Symptome innerhalb des ersten Krankheitsjahres wieder. Häufig sind Kinder von der Krankheit betroffen (Scaradavou et al., 1997). In der Veterinärmedizin findet der Begriff ebenfalls in Verbindung mit Hauteinblutungen Anwendung. Als Morbus maculosus equorum wird ein klinisches Bild bezeichnet, welches auf eine entzündliche Gefäßveränderung zurückzuführen ist. Infolgedessen verlassen Erythrozyten den intravasalen Raum (hämorrhagische Diathese) (Huskamp, 2006). Diese Vaskulitis kann primär durch Viren (Arteriviren) verursacht werden oder sekundär infolge von Infektionen oder Allergien auftreten (Huskamp, 2006).

Bei der sekundären Ursache spielen vor allem Immunkomplexbildungen eine Rolle, die zu einer Schädigung der Gefäßwände führen (Huskamp, 2006). Morbus maculosus beim Schwein wird lediglich im Zusammenhang mit einer *M. suis*-Infektion beschrieben (Heinritzi, 1990b). Die Pathogenese dieser Hauteinblutungen wurde ursprünglich auf eine Verbrauchskoagulopathie zurückgeführt, da bei infizierten Schweinen eine verlängerte Thromboplastinzeit und eine verminderte Thrombozytenzahl nachgewiesen wurde (Heinritzi, 1990b; Waldmann, 2004). Aktuelle Studien deuten jedoch auf eine umfangreichere Pathogenese hin. Untersuchungen von Sokoli et al. (2013) belegen einen erweiterten *M. suis*-spezifischen Zelltropismus für Endothelzellen, der mit einer Aktivierung und Funktionsstörung des Endothels sowie einer Zerstörung der Endothel-Zellstrukturen verbunden ist und insofern eine Ursache für hämorrhagische Diathesen darstellen könnte. Demzufolge sind eine vermehrte Durchlässigkeit der Gefäße und das Austreten von Blutbestandteilen in das Gewebe möglich. Als Ursache der Hautveränderungen ist eine Kombination aus einer Immunkomplex-vermittelten Genese und der Endothel-Interaktion und Zerstörung denkbar. Bei den Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Sokoli et al. (2013) wurde ebenfalls das *M. suis*-Isolat KI3806 wie in der vorliegenden Studie verwendet.

Bisher wurde Morbus maculosus nach experimenteller Infektion mit *M. suis* nur bei splenektomierten Tieren frühestens drei Monate nach der Infektion beobachtet. Das frühe Auftreten dieser Symptome bei den nicht splenektomierten Tieren könnte durch die hochvirulenten Eigenschaften von KI3806 begründet sein. Interessanterweise wurden erythematöse Hautveränderungen auch beim Menschen im Zusammenhang mit *M. pneumoniae*-Infektionen beschrieben. Als Ursache für die Hautveränderungen werden immunkomplexbedingte Gefäßläsionen oder autoimmune Prozesse diskutiert (Schalock et al., 2005; Sanchez-Vargas und Gomez-Duarte, 2008). Die Genese der Hautveränderung ist bisher weder bei *M. pneumoniae* noch bei *M. suis* vollständig geklärt (Waites und Talkington, 2004). Ob die Hautveränderungen in einem Zusammenhang zu den autoimmunen Vorgängen stehen, die bei der Pathogenese von *M. suis* eine wichtige Rolle spielen ist derzeit noch nicht hinreichend untersucht.

## **2. Auswirkungen von *M. suis* auf die untersuchten Blutparameter**

Bereits vier Tagen p.i. konnte bei den splenektomierten Tieren anhand des RBC-Wertes, der Hämoglobinkonzentration und des Hämatokrits eine Anämie festgestellt werden, deren Schweregrad sich mit ansteigender Erregermenge intensivierte. Am Tag acht nach der Infektion war die Anämie bei allen Tieren der Gruppe A (splenektomiert) als hochgradig einzustufen. Die Einteilung des Schweregrads der Anämie richtete sich nach Werten aus der Kleintiermedizin (Nelson und Couto, 2006). Diese wurden ins Verhältnis zu den hämatologischen Normwerten des Schweins gesetzt (Kixmöller et al., 2006). Der Zusammenhang zwischen Erregermenge und Schweregrad der Anämie entspricht den Ergebnissen, die von Grimm et al. (2008) und Hoelzle et al. (2009) publiziert wurden. Auch bei diesen vorangegangenen Untersuchungen von Feldstamminfektionen konnte eine Korrelation zwischen der Erregermenge im Blut von *M. suis* mit den Blutparametern Hämatokrit, Hämoglobin und des RBC-Wertes festgestellt werden.

Die hämatologischen Werte der nicht splenektomierten Tiere entsprachen in den ersten 10 Tagen nach der Infektion einer geringgradigen Anämie. Danach erreichten sie wieder den Referenzbereich. Offenbar stellte sich ein Gleichgewicht zwischen *M. suis* und seinem Wirt ein. Infolgedessen trat, im Gegensatz zu den Tieren der Gruppe A, weder die schlagartige Erregervermehrung noch die damit verbundene Hämolyse auf. Hierbei kommt offensichtlich der Milz als größtes lymphoretikuläres Organ eine bedeutende Rolle zu. Neben Thrombozyten werden auch geschädigte Erythrozyten durch Makrophagen der roten Milzpulpa gefiltert bzw. phagozytiert. Durch die Phagozytose der geschädigten Erythrozyten wird die Erregermenge von *M. suis* dezimiert, da das Bakterium größtenteils an der Erythrozytenoberfläche zu finden ist. Die weiße Milzpulpa stellt darüber hinaus eine wichtige Bildungsstätte von Lymphozyten dar. Eine Splenektomie bedeutet demnach die Induktion einer massiven Immunsuppression. Die Folgen dieses Eingriffes werden durch die signifikanten Unterschiede der Befunde zwischen den beiden Versuchsgruppen verdeutlicht. In der Humanmedizin wird das sogenannte overwhelming post-splenectomy infection (OPSI) beschrieben (Waghorn, 2001; Morgan und Tomich, 2012). Dabei handelt es sich um ein Krankheitsbild mit einer foudroyant verlaufenen Septikämie und rascher Todesfolge. Die OPSI tritt

bei Menschen mit kongenitaler Asplenie oder Menschen nach einer Splenektomie auf. Als Sepsisursache werden hier jedoch vor allem bekapselte Bakterien wie *Streptococcus pneumoniae* isoliert, die normalerweise durch das Makrophagensystem der Milz eliminiert werden (Waghorn, 2001; Morgan und Tomich, 2012).

Das hämatologische Blutbild entsprach in beiden Gruppen dem einer normochromen normozytären Anämie. Diese Anämieform wurde auch bei *M. suis*-infizierten Tieren nach einer Feldinfektion festgestellt (Ritzmann et al., 2009). Der Anämie liegen verschiedene Pathomechanismen zugrunde, wie die direkte Schädigung der Erythrozyten, die Induktion des programmierten Zelltods durch *M. suis* sowie autoimmune Prozesse. Die Ursache für die Entstehung der autoimmunen Hämolyse ist die Bildung von Autoantikörpern sowohl der Antikörperklasse IgG als auch der Klasse IgM. Beide, die warm-reaktiven IgGs als auch die kalt-reaktiven IgM-Autoantikörper sind gegen Erythrozytenkomponenten gerichtet (Hoelzle, 2008). Da die hochgradig anämischen Tiere der Gruppe A schon eine Woche nach der Infektion euthanasiert wurden, spielen vor allem die IgG-Antikörper eine Rolle. Diese werden offensichtlich unmittelbar nach der Infektion induziert (Hoelzle et al., 2006), wohingegen die IgM-Antikörperbildung erst vier Wochen nach Infektion beginnt (Hoelzle, 2008). Auch bei den Tieren der Gruppe B kann von einer IgG-induzierten extravasalen Hämolyse ausgegangen werden, da der Höhepunkt der Anämie acht bis 14 Tage nach der Infektion erreicht wurde und die entsprechenden Blutparameter im weiteren Infektionsverlauf wieder innerhalb des Referenzbereiches verliefen. Ein weiterer Aspekt der für eine extravasale Hämolyse spricht, ist der hohe Bilirubinspiegel im Blut der splenektomierten Tiere nach zwei Tagen p.i.. Bilirubin wird physiologischerweise nach der Phagozytose der opsonisierten Erythrozyten zur Leber transportiert, wo die Glucoronidierung stattfindet. Wenn die Kapazitäten der Hepatozyten erschöpft sind, wird prähepatisches Bilirubin im Serum messbar (Khan und Yassin, 2009). Eine Überschreitung der Hepatozytenkapazität für Bilirubin bei den Versuchstieren ist aufgrund der massiven Hämolyse durch *M. suis* denkbar. Da die Anämie bei den Tieren der Gruppe B (nicht splenektomiert) die Anämie wesentlich milder verlief fand hier vermutlich kein signifikanter Anstieg des Bilirubins statt.



Die Blutglukose sank bei allen splenektomierten Tieren auf lebensbedrohliche Werte ab. Mittlerweile ist bekannt, dass *M. suis* die Glukose seines Wirts als Hauptquelle für seinen Energiestoffwechsel nutzt (Oehlerking et al. 2011; Felder et al. 2012). Die sehr rasche Zellproliferation des hochvirulenten Isolats KI3806 benötigt hohe Mengen an Glukose, was zu einer massiven Hypoglykämie der Versuchstiere führte. Ein Ausgleich über glukosegenerierende Prozesse, wie der Glukoneogenese ist nicht ausreichend um der Hypoglykämie entgegenzuwirken. Die Serumglukose fiel bei den splenektomierten Tieren auf Werte bis zu 0 mmol/ml. Andere Serumparameter (Pankreas-Lipase und -Amylase, Eisen) blieben über den gesamten Versuchsverlauf in beiden Gruppen im Referenzbereich. Es fiel jedoch der milde Anstieg des Serumeisens innerhalb des Referenzbereiches bei den splenektomierten Tieren auf. Laut Heinritzi (1990b) ist ein Anstieg der Eisenkonzentration bei einer *M. suis*-Infektion möglich, da dieses durch den verstärkten Erythrozytenabbau vermehrt frei wird. Bei den nicht splenektomierten Tieren waren keine auffälligen Schwankungen der Serumeisenkonzentration zu beobachten. Folglich ist die Veränderung der Eisenkonzentration ein Kennzeichen einer akuten IAP und kein Merkmal der chronischen Verlaufsform. Diese Ergebnisse entsprechen vorangegangenen Studien von Grimm et al., (2008) bei denen bei einer chronischen *M. suis*-Infektion ebenfalls keine Korrelation zwischen dem Serumeisen und der Erregermenge im Blut nachgewiesen konnte. Die Pankreasenzyme wurden von Grimm et al. (2008) nicht untersucht.

Der Harnstoff stieg bei allen Tieren der Gruppe A (splenektomiert) ab dem sechsten Tag p.i. an. Als Ursache hierfür wäre eine Beeinträchtigung der Nierenfunktion durch erregerinduzierte Mikrothromben denkbar. Eine direkte Schädigung der Nierentubuli durch *M. suis* ist als eher unwahrscheinlich anzusehen, da der Anstieg des Harnstoffs sehr früh nach der Infektion erfolgte. Bei einer direkten Schädigung würde die Nierenfunktion vom gesunden Nierenparenchym aufrechterhalten werden, bis über zwei Drittel des Organs geschädigt sind. Fütterungsbedingte Schwankungen des Harnstoffs sind aufgrund der standardisierten Blutentnahme mehrere Stunden nach der Fütterung auszuschließen.

### 3. Erregermenge im Blut

Bei den Tieren der Gruppe A (splenektomiert) konnte bereits zwei Tage nach der experimentellen Infektion *M. suis*-DNA im Blut nachgewiesen werden. Die Erregermenge war bei den splenektomierten Tieren signifikant höher als bei den nicht splenektomierten Tieren. Weiterhin konnte ein Zusammenhang zwischen der Erregermenge im Blut und den klinischen Symptomen festgestellt werden. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu Untersuchungen von Hoelzle et al. (2009), bei denen die Erregermenge nicht mit der klinischen Symptomatik korrelierte. Die Befunde der vorliegenden Studie deuten auf eine rasante Vermehrung des Erregers bei den splenektomierten Tieren hin und begründen die sehr kurze Inkubationszeit. Die fortgeschrittene Anpassung des untersuchten Isolats an seinen Wirt könnte als Ursache für die schnelle Replikation des Erregers diskutiert werden. Darüber hinaus könnten der erweiterte Zelltropismus und die Invasion des *M. suis*-Isolats KI3806 in die Erythrozyten die schnelle Vermehrung des Erregers begünstigen.

Bei den Tieren der Gruppe B (nicht splenektomiert) war nach vier Tagen p.i. *M. suis*-DNA in der PCR nachweisbar. Die Tiere zeigten mildere Symptome einer IAP als die Tiere der Gruppe A. In vorangegangenen Infektionsversuchen bei denen nicht splenektomierte immunkompetente Tiere mit weniger virulenten *M. suis*-Isolaten infiziert wurden, konnte keine klinische Manifestation einer IAP festgestellt werden (Heinritzi, 1990b). Aus diesem Grund galt die IAP bisher als Faktorenerkrankung, bei der verschiedene Stressfaktoren, eine hohe Infektionsdosis oder eine hohe Virulenz zum klinischen Bild der IAP führen können (Hoelzle, 2011). In der vorliegenden Studie manifestierte sich das *M. suis*-Isolat KI3806 klinisch, ohne dass die Tiere immunsupprimierenden Einflüssen ausgesetzt waren. Die Erregermenge war mit einem Maximum von  $10^5$  *M. suis*/ml Blut vergleichsweise niedrig. Den Ergebnissen der vorliegenden Studie zufolge könnte die Virulenz von *M. suis* als das auslösende Kriterium für die klinische Symptomatik angesehen werden.

### 4. Untersuchungen zur humoralen Immunantwort

Bei der Untersuchung der humoralen Immunantwort konnten in der Gruppe A

(splenektomiert) keine *M. suis*-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Bei den Tieren der Gruppe B (nicht splenektomiert) wurden im Gegensatz dazu ab dem Tag acht nach der Infektion rHspA1-Antikörper detektiert. Die splenektomierten Tiere wurden euthanasiert, bevor eine humorale Immunantwort messbar wurde. Die Resultate entsprechen der Studie von Hoelzle et al. (2009) zur Möglichkeit einer Vakzination gegen *M. suis*, bei der die humorale Immunantwort ab dem siebten Tagen p.i. festgestellt wurde. Auch bei dieser Studie wurde eine stabile Immunantwort über einen Versuchszeitraum von 84 Tagen festgestellt, die in unterschiedlichen Intervallen kurzzeitig abfiel. Die Ursache dafür könnte der Verbrauch der Antikörper sein, der durch eine intensive Erregervermehrung forciert wird (Hoelzle, 2008). Es ist zu berücksichtigen, dass ELISA-OD Werte zwar Eindrücke darüber liefern wie stark eine Immunantwort ausgeprägt ist, jedoch keine quantitative Aussagekraft über die reale Antikörpermenge ermöglichen.

## **5. Ausscheidungsverhalten von *M. suis***

Obwohl *M. suis*-Infektionen schon seit mehr als 80 Jahren bekannt sind, sind die Übertragungswege des Erregers der IAP noch nicht vollständig geklärt (Messick, 2004; Hoelzle, 2008). Die Übertragung von *M. suis* erfolgt nach bisherigem Kenntnisstand nur über Blut oder bluthaltige Sekrete. Die Infektion kann z.B. über blutkontaminierte Gegenstände im Rahmen von zootechnischen Maßnahmen, bei Rankämpfen oder über blutsaugende Arthropoden stattfinden (Henry, 1979; Henderson et al., 1997; Hoelzle, 2008). In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass *M. suis* auch im Urin experimentell infizierter, splenektomierter Tiere zu finden ist. Bisher ging man davon aus, dass Urin nur dann eine potenzielle Infektionsquelle darstellt, wenn dieser Blutbestandteile enthält (Heinritzi, 1990b). In den vorliegenden Untersuchungen wurde *M. suis*-DNA auch in Urinproben nachgewiesen, die keine Erythrozyten beinhalten. Bei der Entnahme und der Verarbeitung der Tupferproben konnte keine Blutkontamination festgestellt werden. Die Proben wurden vor der Blutentnahme entnommen, um das Risiko der Kontamination mit Blut zu minimieren. Die Ergebnisse der Studie deuten darauf hin, dass Speichel, Nasen- und Vaginalsekret neben dem Urin potentielle Übertragungswege von *M. suis* darstellen. Darüber

hinaus konnte ein Zusammenhang zwischen der Erregermenge im Blut und der Erregermenge in den Tupferproben bzw. Urinproben festgestellt werden. *M. suis*-DNA wurde ab einer Erregermenge von  $5,0 \times 10^6$  *M. suis*/ml Blut in den Tupferproben respektive im Urin nachgewiesen. Eine Erregermenge von  $10^6$  *M. suis*/ ml Blut und höher ist durchaus im Blut natürlich infizierter Tiere zu finden (Grimm et al., 2008). Mikroskopische Untersuchungen ergaben, dass *M. suis* bei einer hohen Erregermenge nicht nur direkt an den Erythrozyten, sondern auch frei im Blutplasma infizierter Tiere vorkommt (Heinritzi, 1990b). Es ist folglich vorstellbar, dass *M. suis* auch in blutfreien Se- und Exkreten zu finden ist. Bei den Tieren der Gruppe B (nicht splenektomiert) konnte ebenfalls *M. suis*-DNA im Nasen- und Speicheltupfer nachgewiesen werden. Ein Zusammenhang zwischen der Erregermenge im Blut und der Erregermenge in den Tupferproben war bei den Tieren der Gruppe B hingegen nicht feststellbar. Die molekularbiologische Untersuchung der Urinproben sowie der Vaginaltupfer auf *M. suis* verlief bei den nicht splenektomierten Tieren innerhalb der ersten acht Tage p.i. negativ. Die geringere Erregermenge im Blut der nicht splenektomierten Tiere könnte als mögliche Ursache für den fehlenden Nachweis von *M. suis* im Urin und Vaginalsekret innerhalb der ersten acht Tage p.i. angesehen werden. Um aufzuklären welche Mechanismen für die Ausscheidung von *M. suis* über Sekrete und Exkrete verantwortlich sind, bedarf es weiterführender Untersuchungen. Für andere Mykoplasmen-Spezies sind ähnliche Übertragungswege bekannt. *M. mycoides* spp. *mycoides* wird durch die orale Aufnahme von Nasensekret, Speichel sowie Urin übertragen (DaMassa et al., 1986; Smith und Sherman, 1994). '*Candidatus M. turicensis*' wird in der frühen Phase der Infektion über Urin und Kot ausgeschieden, nicht jedoch in der späten inapparenten Phase der experimentellen Infektion (Willi et al., 2007). Die Untersuchungen der vorliegenden Studie zur Übertragung des *M. suis*-Isolats KI 3806 beziehen sich ebenfalls auf das frühe Stadium der experimentellen Infektion. Um das Ausscheidungsverhalten von weniger virulenten *M. suis*-Isolaten zu untersuchen sind weiterführende Studien notwendig.

Aufgrund der hohen Erregermenge in Tupfer- und Urinproben ist eine Übertragung von *M. suis* innerhalb einer Herde durch orale Aufnahme von Urin oder dem natürlichen Kontakt der Tiere untereinander durchaus denkbar. Der Nachweis von *M. suis*-DNA mittels PCR erlaubt keine Aussage über die

Vermehrungsfähigkeit des Erregers. Vorangegangene Studien von Henderson et al. (1997), die vor der Etablierung molekularbiologischer Untersuchungsmethoden zum Nachweis von *M. suis* durchgeführt wurden, berichteten von einer vertikalen Übertragung von den Sauen auf die Ferkel. Der Nachweis von *M. suis*-DNA im Vaginalsekret in der vorliegenden Studie unterstützt die Beobachtungen von Henderson et al. (1997).

Im Gegensatz zu '*Candidatus M. turicensis*' (Willi et al., 2007) konnte *M. suis*-DNA in der vorliegenden Studie nicht in Kotproben nachgewiesen werden. Offensichtlich fand keine Übertragung von *M. suis* von der intestinalen Mukosa auf die Fäzes statt. Das Auftreten von falsch negativen Ergebnissen konnte durch Verwendung des Stool DNA-Isolation Kit und artifiziell kontaminierten *M. suis*-Kontrollen minimiert werden. Bei '*Candidatus M. turicensis*'-infizierten Katzen wurde der Erreger insgesamt nicht kontinuierlich (an 17 von 100 experimentellen Tagen) im Kot nachgewiesen, wohingegen ein Erregernachweis im Speichel über 45 Tage hinweg möglich war. Folglich ist nicht auszuschließen, dass *M. suis* zu einer späteren Phase der Infektion im Kot nachweisbar sein könnte, wenn ebenfalls eine nicht-kontinuierliche Erregerausscheidung zugrunde liegt.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

*Mycoplasma suis* ist das ätiologische Agens der infektiösen Anämie des Schweins (IAP), der häufigsten Anämieform des Schweins. Es wurden verschiedene virulente *M. suis*-Isolate beschrieben, die sich in ihren Eigenschaften, insbesondere ihrer Erythrozyten-Invasivität unterscheiden. Folglich kann der Schweregrad der Symptome einer IAP variieren.

In der vorliegenden Studie wurde der Verlauf einer experimentellen Infektion mit dem hochvirulenten und invasiven *M. suis*-Isolat KI3806 bei splenektomierten und nicht splenektomierten Schweinen verglichen. Es wurde eine Korrelation zwischen der Erregermenge im Blut mit den klinischen Symptomen sowie den hämatologischen Parametern untersucht. Es erfolgte in beiden Versuchsgruppen eine Untersuchung der humoralen Immunantwort. Die *M. suis*-DNA wurde mithilfe einer quantitativen LightCycler MSG1-PCR detektiert und quantifiziert. Des Weiteren wurden in den ersten acht Tagen p.i. Nasen-, Speichel- und Vaginaltupfer sowie Urin- und Kotproben auf das Vorhandensein von *M. suis*-DNA mittels quantitativer LC-PCR überprüft.

Die tägliche klinische Untersuchung ergab signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Die splenektomierten Tiere wurden aufgrund hochgradiger Anämie, Fieber und einer lebensbedrohlichen Hypoglykämie bis zum achten Tag nach der Infektion euthanasiert. Weiterhin wurde ein Anstieg des Bilirubins und des Harnstoffes festgestellt. Die nicht splenektomierten Tiere zeigten im Gegensatz dazu mildere Symptome einer IAP mit einer mittelgradigen Anämie und petechialen Hautveränderungen vom Bild des Morbus maculosus.

Es konnten signifikante Unterschiede beim Schweregrad der Anämie und der klinischen Symptomatik zwischen splenektomierten und nicht splenektomierten Tieren festgestellt werden.

Mit einem rekombinanten HspA1-ELISA wurde bei den splenektomierten Tieren eine stabile humorale Immunantwort detektiert. Es erfolgte jedoch keine vollständige Erregerelimination innerhalb des Versuchszeitraums.

Bei den splenektomierten Tieren konnte ab dem sechsten Tag p.i. *M. suis*-DNA sowohl in Tupferproben als auch im Urin festgestellt werden. Der Nachweis von

*M. suis* in Nasen- und Speicheltupfern gelang bei den nicht splenektomierten Tieren ebenfalls ab dem sechsten Tag p.i. In keiner der beiden Versuchsgruppen konnte *M. suis*-DNA im Kot nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Studie wird erstmals von einer klinisch manifesten IAP bei nicht splenektomierten Tieren unter experimentellen Bedingungen berichtet. Des Weiteren wurden neue potentielle Übertragungswege von *M. suis* sowohl über Nasen-, Speichel- und Vaginalsekret als auch über den Urin festgestellt. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie verdeutlichen die steigende Virulenz von *M. suis* und erweitern den bisherigen Kenntnissstand über das hochvirulente *M. suis*-Isolats KI3806.

## VII. SUMMARY

Infectious anemia in pig (IAP) caused by *Mycoplasma suis* can manifest itself in various clinical conditions due to varying virulence of different *M. suis*-isolates. The study investigates the course of experimental infection with the highly virulent invasive *M. suis* strain KI3806 comparing the splenectomized and the not splenectomized pig model. Clinical and hematological parameters, their correlation with *M. suis*-blood loads as well as the humoral immune response were monitored throughout the experiment by including two groups of pigs. A quantitative LightCycler MSG1-PCR was used to detect and quantify *M. suis*-DNA. For eight days p.i. vaginal, nasal and salivary swabs, as well as urine and feces were tested for the presence of *M. suis*-DNA by using quantitative LC-PCR.

The results of the clinical examination revealed significant deviations between both study groups. Splenectomized *M. suis* infected pigs had to be euthanized eight days post infection due to severe anemia, fever and life threatening hypoglycemia. Furthermore, an increase of bilirubin and urea concentration could be observed. Not splenectomized pigs showed signs of IAP with mild anemia and hemorrhagic diathesis resembling the syndrome of Morbus maculosus. Correlating with the bacterial load, the severity of hemolytic anemia varied significantly between both groups. An immune response was detected by recombinant HspA1-ELISA in the not splenectomized group. However, *M. suis* was not eliminated by specific antibodies throughout the experiment. From day six p.i. *M. suis*-shedding was found in saliva, nasal and vaginal secrets as well as in urine of splenectomized pigs. Even in swabs from not splenectomized pigs *M. suis*-DNA was detected from day six p.i.. In neither group *M. suis*-DNA could be detected in feces.

This is the first report to describe clinically manifest IAP and alterations in hematological parameters in not splenectomized pigs after experimental infection. Furthermore, the results provide new insights into potential transmission routes of *M. suis* via saliva, nasal and vaginal secret as well as urine. The study clearly demonstrates the increasing virulence of the bacterium and enhances the knowledge of the clinical impact of the highly virulent *M. suis*-isolate KI3806.



## VIII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Phylogenetische Analyse der 16S rRNA-Gensequenz neu beschriebener Hämoplasmaspezies und anderen vorkommenden Hämoplasmaspezies (Steer et al. 2011). .....	5
Abbildung 2: Rasterelektronenmikroskopische und transmissions-elektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>M. suis</i> am Erythrozyten. Es sind verschiedene Reifungsstadien von <i>M. suis</i> (dMs, scMs, Ms1), Invaginationen der Erythrozytenoberfläche sowie Invasionsnarben (IS) dargestellt (Groebel et al., 2009). .....	12
Abbildung 3: Mikroagglutination an der Wand eines Reagenzglases im Vergleich zu dem Blut eines gesunden Tieres (Bild: Heinritzi).....	17
Abbildung 4: Akridinorange-gefärbter Ausstrich Blutaussstrich während einer akuten IAP. Vergrößerung 100-fach (Bild: Heinritzi).....	19
Abbildung 5: (a) Generalisierte und (b) lokale Hautveränderungen eines Tieres der Gruppe B (nicht splenektomiert). .....	36
Abbildung 6: Vergleich der Mittelwerte der hämatologischen Blutparameter der Tiere der Gruppe A (splenektomiert) und der Gruppe B (nicht splenektomiert) innerhalb der ersten acht Tage p.i. (x-Achse). Die gestrichelten Linien stellen den Referenzbereich dar. Die gepunkteten Linien markieren den Übergang zu einer mittel- bzw. hochgradigen Anämie.....	39
Abbildung 7: Korrelation der mittleren Erregermenge im Blut mit dem Mittelwert der hämatologischen Parameter bei den Tieren der Gruppe A (splenektomiert) innerhalb der ersten acht Tage p.i. (x-Achse). ( $P < 0,05$ ). .....	40
Abbildung 8: Vergleich der Mittelwerte der klinisch-chemischen Blutparameter der Tiere der Gruppe A (splenektomiert) und der Gruppe B (nicht splenektomiert) innerhalb der ersten acht Tage p.i. (x-Achse). Die gestrichelten Linien stellen den Referenzbereich dar. ....	42
Abbildung 9: Korrelation der mittleren Erregermenge im Blut mit dem Mittelwert der klinisch-chemischen Parameter bei den Tieren der Gruppe A (splenektomiert) innerhalb der ersten acht Tage p.i. (x-Achse). ( $P < 0,05$ ). .....	43
Abbildung 10: Darstellung der mittleren Serumeisenkonzentration von den Tieren der Gruppe A (splenektomiert) innerhalb der ersten 8 Versuchstage (x-Achse). Die y-Achse stellt die durchschnittliche Erregermenge im Blut dar. ....	44
Abbildung 11: Vergleich der Erregermenge im Blut bei den Tieren der Gruppe A (splenektomiert) und den Tieren der Gruppe B (nicht splenektomiert) innerhalb der ersten acht Tage p.i.. Die Erregermenge ist als logarithmische DNA-Kopienanzahl dargestellt.....	47
Abbildung 12: Vergleich der Mittelwerte der Erregermenge im Blut der <i>M. suis</i> -positiven Versuchstiere der Gruppe A (splenektomiert) und der Gruppe B (nicht	

---

splenektomiert) ( $P < 0,05$ ). Die Darstellung ist logarithmisch skaliert. ....48

Abbildung 13: Darstellung der mittleren Erregermenge im Blut der Tiere der Gruppe B und der mittleren ELISA OD-Werten innerhalb des gesamten Versuchszeitraums (x-Achse) .....52

## **IX. TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1: Versuchsablauf .....	25
Tabelle 2: Bewertungsschema („Score-System“) für die klinische Untersuchung .....	28
Tabelle 3: Korrelation zwischen der Erregermenge im Blut und den Blutparametern.....	45
Tabelle 4: Mittlere Erregermenge im Blut während des Infektionsverlaufes, bestimmt mittels LC-PCR.....	49
Tabelle 5: Ergebnisse der LC-PCR.....	51

## X. LITERATURVERZEICHNIS

Biondo, A.W., dos Santos, A.P., Guimarães, A.M.S., da Costa Vieira, R.F., Vidotto, O., de Barros Macieira, D., Almosny, N.R.P., Molento, M.B., Timenetsky, J., de Moraes, H.A., Díaz González, F.H. and Messick, J.B., 2009. A review of the occurrence of hemoplasmas (hemotrophic mycoplasmas) in Brazil. *Revista Brasileira De Parasitologia Veterinaria* 18, 1-7.

Bosnic, D., Baresic, M., Anic, B., Sentic, M., Cerovec, M., Mayer, M. and Cikes, N., 2010. Rare zoonosis (hemotrophic mycoplasma infection) in a newly diagnosed systemic lupus erythematosus patient followed by a *Nocardia asteroides* pneumonia. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 14, 92-95.

Brownback, A., 1981. Eperythrozoonosis as a cause of infertility in swine. *Veterinary Medicine & Small Animal Clinician* 76, 375-378.

Bugnowski, H., Horsch, F., Müller, D. and Zepezauer, V., 1986. Eperythrozoonose (Ikteroanämie) des Schweins. *Monatshefte Für Veterinärmedizin* 41, 145-148.

DaMassa, A.J., Brooks, D.L. and Holmberg C.A., 1986. Induction of mycoplasmosis in goat kids by oral inoculation with *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides*. *American Journal of Veterinary Research* 47, 2084.

dos Santos, A.P., dos Santos, R.P., Biondo, A.W., Dora, J.M., Goldani, L.Z., de Oliveira, S.T., Guimaraes, A.M.S., Timenetsky, J., de Moraes, H.A., Gonzalez, F.H.D. and Messick, J.B., 2008. Hemoplasma Infection in HIV-positive Patient, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 14, 1922-1924.

Doyle, L.P., 1932. A Rickettsia-like or anaplasmosis-like disease in swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 34, 668-671.

Felder, K.M., Hoelzle, K., Heinritzi, K., Ritzmann, M. and Hoelzle, L.E., 2010. Antibodies to actin in autoimmune haemolytic anaemia. *BMC Veterinary*

Research 6, 18.

Felder, K.M., Hoelzle, K., Ritzmann, M., Kilchling, T., Schiele, D., Heinritzi, K., Groebel, K. and Hoelzle, L.E., 2011. Hemotrophic Mycoplasmas Induce Programmed Cell Death in Red Blood Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry* 27, 557-564.

Felder, K.M., Carranza, P.M., Gehrig, P.M., Roschitzki, B., Barkow-Oesterreicher, S., Hoelzle, K., Riedel, K., Kube, M. and Hoelzle, L.E., 2012. Insights into the Gene Expression Profile of Uncultivable Hemotrophic *Mycoplasma suis* during Acute Infection, Obtained Using Proteome Analysis. *Journal of Bacteriology* 194, 1505-1514.

Grimm, J., Ritzmann, M., Heinritzi, K., Wittenbrink, M.M., Hoelzle, K. and Hoelzle, L.E., 2008. Untersuchungen zur Prävalenz von *Mycoplasma suis* in Deutschland mittels real-time Polymerasekettenreaktion. *Tierärztliche Umschau* 63, 21-25.

Groebel, K., Hoelzle, K., Wittenbrink, M.M., Ziegler, U. and Hoelzle, L.E., 2009. *Mycoplasma suis* Invades Porcine Erythrocytes. *Infection and Immunity* 77, 576-584.

Guimaraes, A.M.S., dos Santos, A.P., SanMiguel, P., Walter, T., Timenetsky, J. and Messick, J.B., 2011a. Complete Genome Sequence of *Mycoplasma suis* and Insights into Its Biology and Adaption to an Erythrocyte Niche. *Plos One* 6.

Guimaraes A.M.S., da Costa Vieira R.F., Poletto R., Vemulapalli R., dos Santos A.P., de Moraes W., Cubas Z.S., Santos L.C., Marchant-Forde J.N., Timenetsky J., Biondo A.W., Messick J.B., 2011b. A quantitative TaqMan PCR assay for the detection of *Mycoplasma suis*. *Journal of Applied Microbiology* 111, 417-425.

Guimaraes A.M., Santos A.P., Timenetsky J., Bower L.P., Strait E., Messick J.B., 2014. Identification of *Mycoplasma suis* antigens and development of a multiplex microbead immunoassay. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 20,

[Epub ahead of print].

Gwaltney, S.M., Hays, M.P. and Oberst, R.D., 1993. Detection of Eperythrozoon-suis using the polymerase chain-reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 5, 40-46.

Gwaltney, S.M. and Oberst, R.D., 1994. Comparison of an improved polymerase chain-reaction protocol and the indirect hemagglutination assay in the detection of Eperythrozoon-suis infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 6, 321-325.

Heinritzi, K., 1984. Ein Beitrag zur Splenektomie beim Schwein. *Tierärztliche Praxis* 12, 451-454.

Heinritzi, K., 1990a. Zur Diagnostik der Eperythrozoon-suis-Infektion. *Tierärztliche Praxis* 18, 477-481.

Heinritzi, K.H., 1990b. Untersuchungen zur Pathogenese und Diagnostik der Infektion mit Eperythrozoon suis, Habilitationsschrift. München.

Henderson J.P., O'Hagan, J., Hawe, S.M. and Pratt, M.C., 1997. Anaemia and low viability in piglets infected with Eperythrozoon suis. *Veterinary Research* 140, 144-146.

Henry, S.C., 1979. Clinical observations on Eperythrozoonosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 174, 601-603.

Hicks C.A., Barker E.N., Brady C., Stokes C.R., Helps C.R. and Tasker S., 2014. Non-ribosomal phylogenetic exploration of Mollicute species: New insights into haemoplasma taxonomy. *Infection Genetics Evolution* 8, [Epub ahead of print]

Hoelzle, L.E., Adelt, D., Hoelzle, K., Heinritzi, K. and Wittenbrink, M.M., 2003. Development of a diagnostic PCR assay based on novel DNA sequences for the

detection of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) in porcine blood. *Veterinary Microbiology* 93, 185-196.

Hoelzle L.E., Hoelzle K., Ritzmann M., Heinritzi K. and Wittenbrink M.M., 2006. *Mycoplasma suis* antigens recognized during humoral immune response in experimentally infected pigs. *Clinical Vaccine Immunology* 13, 116-122.

Hoelzle, K., Grimm, J., Ritzmann, M., Heinritzi, K., Torgerson, P., Hamburger, A., Wittenbrink, M.M. and Hoelzle, L.E., 2007a. Use of recombinant antigens to detect antibodies against *Mycoplasma suis*, with correlation of serological results to hematological findings. *Clinical and Vaccine Immunology* 14, 1616-1622.

Hoelzle, L.E., Helbling, M., Hoelzle, K., Ritzmann, M., Heinritzi, K. and Wittenbrink, M.M., 2007b. First LightCycler real-time PCR assay for the quantitative detection of *Mycoplasma suis* in clinical samples. *Journal of Microbiological Methods* 70, 346-354.

Hoelzle, L.E., Hoelzle, K., Harder, A., Ritzmann, M., Aupperle, H., Schoon, H.-A., Heinritzi, K. and Wittenbrink, M.M., 2007c. First identification and functional characterization of an immunogenic protein in unculturable haemotrophic *Mycoplasmas* (*Mycoplasma suis* HspA1). *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 49, 215-223.

Hoelzle, L.E., Hoelzle, K., Helbling, M., Aupperle, H., Schoon, H.A., Ritzmann, M., Heinritzi, K., Felder, K.M. and Wittenbrink, M.M., 2007d. MSG1, a surface-localised protein of *Mycoplasma suis* is involved in the adhesion to erythrocytes. *Microbes and Infection* 9, 466-474.

Hoelzle, L.E., 2008. Haemotrophic mycoplasmas: Recent advances in *Mycoplasma suis*. *Veterinary Microbiology* 130, 215-226.

Hoelzle, K., Doser, S., Ritzmann, M., Heinritzi, K., Palzer, A., Elicker, S., Kramer, M., Felder, K.M. and Hoelzle, L.E., 2009. Vaccination with the *Mycoplasma suis* recombinant adhesion protein MSG1 elicits a strong immune

response but fails to induce protection in pigs. Vaccine 27, 5376-5382.

Hoelzle, K., Engels, M., Kramer, M.M., Wittenbrink, M.M., Dieckmann, S.M. and Hoelzle, L.E., 2010. Occurrence of *Mycoplasma suis* in wild boars (*Sus scrofa* L.). Veterinary Microbiology 143, 405-409.

Hoelzle, L.E., Felder, K.M. and Hoelzle, K., 2011. Porcine Eperythrozoonose: Von Eperythrozoon suis zu *Mycoplasma suis*. Tierärztliche Praxis Ausgabe Großtiere Nutztiere 39, 215-220.

Hsu, F. S., Liu, M. C., Chou, S. M., Zachary, J. F. and Smith, A. R., 1992. Evaluation of an enzyme-linked-immunosorbent-assay for detection of Eperythrozoon suis antibodies in swine. American Journal of Veterinary Research 53, 352-354.

Huang, D.S., Guan, P., Wu, W., Shen, T.F., Liu, H.L., Cao, S. and Zhou, H., 2012. Infection rate of Eperythrozoon spp. in Chinese population: a systematic review and meta-analysis since the first Chinese case reported in 1991. BMC Infectious Diseases 12.

Huskamp, B. and Dietz, O., 2006. Handbuch Pferdepraxis. Enke Verlag, Stuttgart.

Khan, F.Y. and Yassin, M.A., 2009. *Mycoplasma pneumoniae* Associated with Severe Autoimmune Hemolytic Anemia: Case Report and Literature Review. Brazilian Journal of Infectious Diseases 13, 77-79.

Kinsley, A.T. and J.D., R., 1934. Anaplasmosis-like disease in swine. Journal of the American Veterinary Medical Association 84, 391-392.

Kixmüller, M., Ritzmann, M. and Heinritzi, K., 2006. Labordiagnostische Referenzbereiche bei Läuferschweinen unterschiedlicher Rassen. Der Praktische Tierarzt 87, 204-213.



Korn, G. and Mussgay, M., 1968. a case of eperythrozoon suis and its differential diagnostic significance in relation to suspected swine fever virus eperythrozoon-suis. Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B 15, 617-630.

Lang, K.S., Lang, P.A., Bauer, C., Duranton, C., Wieder, T., Huber, S.M., Lang, F., 2005. Mechanisms of suicidal erythrocyte death. Cellular Physiology and Biochemistry 15, 195-202.

Liu W., Fang L., Li M., Li S., Guo S., Luo R., Feng Z., Li B., Zhou Z., Shao G., Chen H., Xiao S., 2012. Comparative genomics of Mycoplasma: analysis of conserved essential genes and diversity of the pan-genome. Plos One 7.

Maggi, R.G., Compton, S.M., Trull, C.L., Mascarelli, P.E., Mozayeni, B.R. and Breitschwerdt, E.B., 2013. Infection with hemotropic Mycoplasma species in patients with or without extensive arthropod or animal contact. Journal of Clinical Microbiology 51, 3237-3241.

Messick, J.B., 2004. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insight into pathogenic potential. Veterinary Clinical Pathology 33, 2-13.

Messick, J.B., Smith, G., Berent, L. and Cooper, S., 2000. Genome size of Eperythrozoon suis and hybridization with 16S rRNA gene. Canadian Journal of Microbiology 46, 1082-1086.

Morgan, T.L. and Tomich, E.B., 2012. Overwhelming post-splenectomy infection (opsi): a case report and review of the literature. Journal of Emergency Medicine 43, 758-763.

Neimark, H., Johansson, K.E., Rikihisa, Y. and Tully, J.G., 2001. Proposal to transfer some members of the genera Haemobartonella and Eperythrozoon to the genus Mycoplasma with descriptions of 'Candidatus Mycoplasma haemofelis', 'Candidatus Mycoplasma haemomuris', 'Candidatus Mycoplasma haemosuis' and 'Candidatus Mycoplasma wenyonii'. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51, 891-899.

Neimark, H., Johnsson, K.E., Rikihisa, Y. and Tully, J.G., 2002. Revision of haemotrophic *Mycoplasma* species names. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 683-683.

Nelson, R.W. and Couto, C. G., 2006. *Innere Medizin der Kleintiere*. Elsevier GmbH, München.

Oehlerking, J., Kube, M., Felder, K.M., Matter, D., Wittenbrink, M.M., Schwarzenbach, S., Kramer, M.M., Hoelzle, K. and Hoelzle, L.E., 2011. Complete Genome Sequence of the Hemotrophic *Mycoplasma suis* Strain KI3806. *Journal of Bacteriology* 193, 2369-2370.

Peters, I.R., Helps, C.R., McAuliffe, L., Neimark, H., Lappin, M.R., Gruffydd-Jones, T.J., Day M.J., Hoelzle L.E., Willi B., Meli M., Hofmann-Lehmann R. and Tasker S., 2008. RNase P RNA gene (*rnplB*) phylogeny of Hemoplasmas and other *Mycoplasma* species. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 1873-1877.

Ritzmann, M., Grimm, J., Heinritzi, K., Hoelzle, K. and Hoelzle, L.E., 2009. Prevalence of *Mycoplasma suis* in slaughter pigs, with correlation of PCR results to hematological findings. *Veterinary Microbiology* 133, 84-91.

Sanchez-Vargas, F.M. and Gomez-Duarte, O.G., 2008. *Mycoplasma pneumoniae*-an emerging extra-pulmonary pathogen. *Clinical Microbiology and Infection* 14, 105-117.

Scaradavou, A., Woo, B., Woloski, B.M., Cunningham-Rundles, S., Ettinger, L.J., Aledort, L.M. and Bussel, J.B., 1997. Intravenous anti-D treatment of immune thrombocytopenic purpura: experience in 272 patients. *Blood* 89, 2689-2700.

Schalock, P.C., Brennick, J.B. and Dinulos, J.G.H., 2005. *Mycoplasma pneumoniae* infection associated with bullous erythema multiforme. *Journal of the American Academy of Dermatology* 52, 705-706.

Schilling, V., 1928. E. coccoides, a new cause of infection in mice, activated by splenectomy. *Klinische Wochenschrift* 7, 1853-1855.

Smith M.C. and Sherman D.M., 1994. *Goat Medicine*. Lea and Febiger, Philadelphia, Baltimore, Hong Kong, London, Munich, Sydney, Tokyo, 84-89.

Schreiner, S.A., Sokoli, A., Felder, K.M., Wittenbrink, M.M., Schwarzenbach, S., Guhl, B., Hoelzle, K. and Hoelzle, L.E., 2012. The surface-localised alpha-enolase of *Mycoplasma suis* is an adhesion protein. *Veterinary Microbiology* 156, 88-95.

Schuller, W., Heinritzi, K., Alnuktha, S., Kolbl, S. and Schuh, M., 1990. Serological studies by means of cf-tests and ELISA for evaluation of antibodies against *Eperythrozoon suis*. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 103, 9-12.

Schweighardt, H., Fellner, A., Pechan, P. and Lauermann, E., 1986. Eperythrozoonosis in swine-a case-report. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 73, 250-253.

Sokoli, A., Groebel, K., Hoelzle, K., Amselgruber, W.M., Mateos, J.M., Schneider, M.K.J., Ziegler, U., Felder, K.M. and Hoelzle, L.E., 2013. *Mycoplasma suis* infection results endothelial cell damage and activation: new insight into the cell tropism and pathogenicity of hemotrophic mycoplasma. *Veterinary Research* 44, 6-28.

Splitter, E.J., 1950. Eperythrozoon-suis, the etiologic agent of icterioanemia or an anaplasmosis-like disease in swine. *American Journal of Veterinary Research* 11, 324-330.

Splitter, E.J. and Williamson, R.L., 1950. Eperythrozoonosis in swine; a preliminary report. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 116, 360-364.

Steer, J.A., Tasker, S., Barker, E.N., Jensen, J., Mitchell, J., Stocki, T., Chalker, V.J. and Hamon, M., 2011. A Novel Hemotropic Mycoplasma (Hemoplasma) in a Patient With Hemolytic Anemia and Pyrexia. *Clinical Infectious Diseases* 53, E147-E151.

Strait E.L., Hawkins P.A. and Wilson W.D., 2012. Dysgalactia associated with *Mycoplasma suis* infection in a sow herd. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 15, 1666-1667.

Sykes, J.E., Lindsay, L.L., Maggi, R.G. and Breitschwerdt, E.B., 2010. Human Coinfection with *Bartonella henselae* and Two Hemotropic *Mycoplasma* Variants Resembling *Mycoplasma ovis*. *Journal of Clinical Microbiology* 48, 3782-3785.

Waghorn, D.J., 2001. Overwhelming infection in asplenic patients: current best practice preventive measures are not being followed. *Journal of Clinical Pathology* 54, 214-218.

Waites, K.B. and Talkington, D.F., 2004. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* 17, 697-728.

Waldmann, K.H., Wendt M., 2004. *Lehrbuch der Schweinekrankheiten*. Parey Verlag, Stuttgart.

Watanabe, Y., Fujihara, M., Suzuki, J., Sasaoka, F., Nagai, K. and Harasawa, R., 2012. Prevalence of Swine Hemoplasmas Revealed by Real-Time PCR Using 16S rRNA Gene Primers. *Journal of Veterinary Medical Science* 74, 1315-1318.

Willi, B., Boretti, F.S., Meli, M.L., Bernasconi, M.V., Cascati, S., Hegglin, D., Puorger, M., Neimark, H., Cattori, V., Wengi, N., Wengi, N., Reusch, C.E., Lutz, H. and Hofmann-Lehmann, R., 2007. Real-Time PCR Investigation of Potential Vectors, Reservoirs, and Shedding Patterns of Feline Hemotropic Mycoplasmas. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 3798-3802.

Yuan, C.L., Liang, A.B., Yao, C.B., Yang, Z.B., Zhu, J.G., Cui, L., Yu, F., Zhu, N.Y., Yang, X.W. and Hua, X.G., 2009. Prevalence of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) infection in swine and swine-farm workers in Shanghai, China. *American Journal of Veterinary Research* 70, 890-894.

Zachary, J.F. and Basgall, E.J., 1985. Erythrocyte-membrane alterations associated with the attachment and replication of *Eperythrozoon suis* - a light and electronmicroscopic study. *Veterinary Pathology* 22, 164-170.

Zachary, J.F. and Smith, A.R., 1985. Experimental Porcine Eperythrozoonosis - Lymphocyte-T suppression and misdirected Immuneresponses. *American Journal of Veterinary Research* 46, 821-830.

Zhang, C.Y., Li, Y.F., Jiang, P. and Chen, W., 2012. Use of MSG1 protein in a novel blocking ELISA for the detection of *Mycoplasma suis* infection. *Veterinary Journal* 193, 535-538.

Zhuang, Q.J., Song, H.Q., Zhu, X.Q. and Fu, B.Q., 2010. Human Infecion with Hemoplasma in Mainland China. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 9, 1905-1908.

## **XI. DANKSAGUNG**

An dieser Stelle bedanke ich mich herzlichst bei:

Herrn Prof. Mathias Ritzmann dafür dass er mir das Thema überließ und mir somit eine schöne und prägende Zeit an der Klinik für Schweine ermöglichte.

Frau Dr. Julia Stadler als überragende Betreuerin, die mich unterstützte, motivierte und mir zeigte, dass alles immer noch ein bisschen besser geht.

Frau Dr. Susanne Zöls für ihre spontanen und wirkungsvollen Ideen in den festgefahrenen Momenten und ihre Hilfe bei der Statistik.

Dem gesamten Klinikteam mit besonderer Berücksichtigung von Lisa Beffort, Tanja Frey und Christine Weiß, die mir stets hilfsbereit zur Seite standen und mir auch seelisch und moralisch eine wichtige Stütze waren.

Herrn Dr. Matthias Eddicks, der mich überhaupt erst auf die Idee brachte in der Klinik für Schweine zu promovieren.

Herrn Prof. Ludwig E. Hoelzle und Frau Dr. Katharina Hoelzle aus dem Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik, die diese Dissertation erst ermöglicht haben. Besonderer Dank gilt Frau Dr. Hoelzle für ihre Ausdauer und Unterstützung.

Stefanie Dietz und Sarah-Lena Mack, für die konstruktive und spaßige Zusammenarbeit.